

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Kele Aparecida Costa Vespermann**

**PROCESSO DE BIOCONVERSÃO DE MONOTERPENOS EM DERIVADOS DE  
VALOR AGREGADO**

**Diamantina**

**2019**



**Kele Aparecida Costa Vespermann**

**PROCESSO DE BIOCONVERSÃO DE MONOTERPENOS EM DERIVADOS DE  
VALOR AGREGADO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Molina

**Diamantina**

**2019**



Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V579p

Vespermann, Kele Aparecida Costa

Processo de bioconversão de monoterpenos em derivados de valor agregado / Kele Aparecida Costa Vespermann, 2019.

104 p. : il.

Orientador: Gustavo Molina

Dissertação (Mestrado Profissional – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Bioprocesso. 2. Limoneno. 3. Polygala fimbriata.  
4. Eucalyptus spp. I. Molina, Gustavo. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 664**



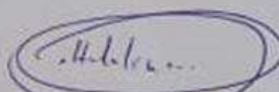
KELE APARECIDA COSTA VESPERMANN

**Processo de bioconversão de monoterpenos em derivados de valor agregado**

Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, nível  
de MESTRADO como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRA EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Molina

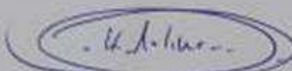
Data da aprovação: 10/06/2019



PROF. DR. GUSTAVO MOLINA – UFVJM



PROFA. DRA. LILIAN DE ARAÚJO PANTOJA – UFVJM



PROF. DR. BRUNO NICOLAU PAULINO - UFAM

DIAMANTINA

À Deus pela sua graça e misericórdia, e sem o qual eu nada seria e nada teria, dedico.



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu porto seguro e razão de persistir na caminhada, pelo seu infinito amor, misericórdia, por ter me dado a força, as pessoas e os meios necessários para concluir esse processo.

Ao meu orientador Gustavo Molina pela oportunidade e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

À FAPEMIG e CNPq pelos fomentos que propiciaram a execução desse trabalho.

À UFVJM pela oportunidade de cursar esse programa de mestrado.

À minha mãe Marilza, pelas orações incessantes, por nas poucas palavras demonstrar seu amor, e por entender a distância.

Aos meus irmãos Bia, Rafa e Maurício por me apoiarem moral- e financeiramente, por serem meus parças nessa batalha e na vida.

Aos meus cunhados (Lay e Edu), vô Irene, meu padastro Azenaldo, meus primos e tios, pelo amor e amizade.

Ao meu primo Alan, pela parceria na coleta de amostras para meus isolamentos.

Às minhas amigas/parceiras Josi e Bibi pela amizade, apoio incondicional e por serem um porto seguro em todos os momentos de dificuldade, sem vocês eu não teria conseguido chegar tão longe. Amo vocês.

Ao meu personal assistente, Carlinhos, pelas ideias e contribuições pro meu/nosso trabalho, por prover alimentos e por ajudar a por minha cabeça pra funcionar nas horas de desespero.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Bibi, Carlos, Dayane, Filipe, Josi, Naty, Thais, Wanessa e a agregada (Renata), pelo apoio, pela amizade, pelos abraços e pelos rolês compartilhados. Vocês são, sem dúvida, uma das melhores partes disso tudo.

Às minhas colegas de república, Letis, Miriam, Rosália e Mayara pela amizade e, principalmente, por me suportarem.

Aos meus amigos/irmãos da 1ª Igreja Batista em Diamantina, pr. Moreira, irmã Neli, Maíra, Prih, Nay, Day, Camila, Zinha, Regina e Talita pela amizade, pelas orações, pelos abraços, conversas e por serem um apoio nas horas alegres e nem tão alegres assim, e a tantos outros que no silêncio de suas orações me ajudaram a prosseguir.

Aos docentes e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pelos ensinamentos compartilhados e pela amizade.

Aos técnicos e funcionários do ICT/EAL, Keylinha, Ilvinha, Mara, Mara (de novo), Natália, Tiago, Saulo e João Paulo, por além de executarem seu trabalho com maestria, por estarem sempre dispostos a ajudar, e também pelo apoio moral de sempre nos momentos de dificuldade.

Ao meu amigo Filipe e ao professor Tiago pela parceria na identificação das linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho.

Aos técnicos Samuel e Eliznara e à professora Fabiane do DCB/UFVJM, e principalmente, à professora Raquel Lütke (UFPEL) pelo auxílio na identificação da minha planta objeto de isolamento.

À Laboratório de Bioaromas da UNICAMP, em nome da prof.<sup>a</sup> Gláucia Pastore e do prof. Juliano Bicas, pela doação de padrões cromatográficos.

Meus mais sinceros agradecimentos à todos os que me ajudaram de todas as formas a alcançar essa conquista.

“As we conquer peak after peak we see in front of us regions full of interest and beauty, but we do not see our goal, we do not see the horizon; in the distance tower still higher peaks, which will yield to those who ascend them still wider prospects, and deepen the feeling, the truth of which is emphasised by every advance in science, that “Great are the Works of the Lord” (J. J. Thomson, 1910).



## RESUMO

O mercado de aditivos alimentares é uma parcela expressiva da indústria de alimentos processados, que vêm buscando, sob a pressão dos consumidores, a utilização de aditivos de origem natural em suas formulações. As limitações impostas pela obtenção via extração natural desses compostos têm incentivado a produção por via biotecnológica. Neste contexto a utilização de biocatalisadores eficientes pode tornar esses processos interessantes do ponto de vista de industrial e econômico, deste modo a seleção de microrganismos de ambientes naturais surge como uma possibilidade para obtenção de tais biocatalisadores. Tal ferramenta é recorrentemente utilizada para a seleção de biocatalisadores para a bioconversão de monoterpenos, que envolvem também a caracterização adequada do processo e a avaliação de parâmetros que forneçam maiores produtividades. A biotransformação de limoneno e  $\alpha$ -pineno têm sido estudada com afincos e propiciado a seleção de microrganismos e desenvolvimento de bioprocessos com possibilidades de aplicação em escala industrial. Este estudo relata a capacidade de bioconversão de  $\alpha$ -pineno e limoneno por linhagens bacterianas endofíticas isoladas de *Polygala fimbriata* e de uma linhagem fúngica isolada de *Eucalyptus* spp. Dentre os 15 microrganismos isolados de *Polygala fimbriata*, 10 bactérias mostraram-se resistentes ao limoneno e 9 ao  $\alpha$ -pineno, sendo que as linhagens mais robustas, LBA1213 e LBA12111 foram avaliadas quanto à formação de produtos a partir dos substratos monoterpênicos em processo de bioconversão. Posteriormente, as linhagens foram identificadas como *Bacillus mycoides* (LBA1213) e *Bacillus* spp. (LBA12111), e demonstraram o potencial de resistência a concentrações de até 10% (v/v) de  $\alpha$ -pineno e/ou limoneno. Ambas as linhagens converteram o  $\alpha$ -pineno em derivados oxigenados, com a formação majoritária de verbenol e de 2 outros compostos minoritários, não identificados. Posteriormente o isolamento e seleção de linhagens a partir de *Eucalyptus* spp. foi executado de modo a se efetivar a utilização de um novo método de seleção de linhagens robustas para a bioconversão de monoterpenos, consistindo num processo de três cultivos por plaqueamento com duração de 9 dias. Este teste resultou na seleção do fungo LBA1323, com potencial em utilizar  $\alpha$ -pineno e limoneno como fonte de carbono e transformá-los majoritariamente a terpineno-4-ol ( $426,14 \pm 140,92$  mg/L) e  $\alpha$ -terpineol ( $360 \pm 56$  mg/L), respectivamente. Na sequência, foi identificado que a formação de terpineno-4-ol é não indutível, considerando que não houve alteração da produção sob efeito da indução enzimática. A análise ultramorfológica deste bioprocessos indicou efeitos tóxicos de  $\alpha$ -pineno sobre a linhagem LBA1323, e possivelmente do terpineno-4-ol. Finalmente, os estudos de permeabilização

celular por congelamento-descongelamento e sonicação, e a utilização de etanol como co-solvente e sistema de micelas reversas com Tween 80 não acarretaram em ganhos na produção de terpineno-4-ol. Em suma, este trabalho trata-se do primeiro relato na literatura do isolamento de linhagens a partir de *Polygala fimbriata*, bem como da utilização de *Bacillus mycoides* em ensaios de bioconversão de monoterpenos. Ademais, permitiu o isolamento de uma nova linhagem fúngica de *Eucalyptus* spp. potencial para a produção de terpineno-4-ol a partir de  $\alpha$ -pineno, tratando-se do segundo trabalho da literatura que envolve a formação majoritária deste composto em processos fermentativos, além da capacidade desta mesma linhagem em bioconverter o limoneno a  $\alpha$ -terpineol.

**Palavras chave:** Bioprocesso.  $\alpha$ -pineno. Limoneno. *Polygala fimbriata*. *Eucalyptus* spp.

## ABSTRACT

The food additives market is an expressive part of processed food industry, which has been seeking, under market pressure, natural additives aggregation in its formulations. The limitations imposed by the natural extraction of these compounds have stimulated the biotechnological production. In this context, the use of efficient biocatalysts can make these processes interesting from an industrial and economic point of view, in this way the selection of microorganisms from natural environments appears as a possibility to obtain such biocatalysts. This tool is frequently used for selecting biocatalysts monoterpenes bioconversion, which also involves proper characterization of the process and evaluation of parameters that provide greater productivity. Biotransformation of limonene and  $\alpha$ -pinene have been studied with great effort, allowing the selection of potential microorganisms and the development of bioprocesses with possible application on an industrial scale. This study reports the ability of bioconversion of  $\alpha$ -pinene and limonene by endophytic bacterial strains isolated from the *Polygala fimbriata* and from a fungal strain isolated from *Eucalyptus* spp. Among the 15 microorganisms isolated from *Polygala fimbriata*, 10 bacteria were resistant to limonene and 9 to  $\alpha$ -pinene, and the most robust strains, LBA1213 and LBA12111, were evaluated for the formation of products from monoterpene substrates in bioconversion. Later, the strains were identified as *Bacillus mycoides* (LBA1213) and *Bacillus* spp. (LBA12111), and demonstrated the potential resistance to concentrations of up to 10% (v/v)  $\alpha$ -pinene and/or limonene. Both strains converted  $\alpha$ -pinene into oxygenated derivatives, with the majority formation of verbenol and 2 other unidentified minor compounds. Afterwards the isolation and selection of strains from *Eucalyptus* spp. was carried out in order to make use of a new method of selection of robust lines for the bioconversion of monoterpenes, consisting of a process of 3 consecutive plating with a 9-day duration. This resulted in the selection of LBA1323 (fungus), with potential to use  $\alpha$ -pinene and limonene as carbon source and to transform them mainly to terpinene-4-ol ( $426,14 \pm 140,92$  mg/L) and  $\alpha$ -terpineol ( $360 \pm 56$  mg/L), respectively. Subsequently, it was identified that the formation of terpinene-4-ol is non-inducible, considering that there was no change in production under the effect of enzymatic induction. The ultramorphological analysis of this bioprocess indicated toxic effects on LBA1323 cell line when in contact with  $\alpha$ -pinene, and possibly terpinene-4-ol. Finally, freeze-thaw and sonication cell permeabilization studies, and the use of ethanol as a co-solvent and Tween 80 reverse micelle system did not lead to gains in the production of terpinene-4-ol. In summary, this work is the first one to report the isolation of strains from

*Polygala fimbriata* and the use of *Bacillus mycoides* in monoterpene bioconversion assays. In addition, it allowed the isolation of a new fungal lineage of *Eucalyptus* spp., that being a potential strain for the production of terpinene-4-ol from  $\alpha$ -pinene. This is the second work of the literature that involves the major formation of this compound in fermentative processes, besides the capacity of this same strain in convert limonene to  $\alpha$ -terpineol.

**Keywords:** Bioprocess.  $\alpha$ -pinene. Limonene. *Polygala fimbriata*. *Eucalyptus* spp.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	17
REFERÊNCIAS .....	19
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO: DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOAROMAS .....	21
RESUMO.....	21
1.1 Introdução .....	21
1.2 Diversidade microbiana para a obtenção de biomoléculas.....	22
1.3 Obtenção de terpenos .....	24
1.3.1 Pinenos como substratos em processos de bioconversão .....	25
1.3.2 Limoneno como substrato em processo de bioconversão.....	27
1.4 Gênero <i>Bacillus</i> como biocatalisador em processos biotecnológicos .....	28
1.4.1 Versatilidade de linhagens de <i>Bacillus</i> na produção de bioaromas .....	29
1.4.2 Potencial biocatalítico de <i>Bacillus mycoides</i> .....	31
1.5 Conclusão .....	35
REFERÊNCIAS .....	37
2 CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS DE <i>Polygala fimbriata</i> E AVALIAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE MONOTERPENOS ..	45
RESUMO.....	45
2.1 Introdução .....	45
2.2 Material e métodos .....	47
2.2.1 Reagentes e substratos.....	48
2.2.2 Isolamento de microrganismos de <i>Polygala fimbriata</i> .....	48
2.2.3 Caracterização morfológica e coloração de Gram .....	48
2.2.4 Cinética de crescimento padrão das linhagens LBA1213 e LBA12111 em meio YM	49
2.2.5 Teste de resistência à presença de 2% ou 10% (v/v) de monoterpenos .....	50
2.2.6 Preparo de inóculo para os ensaios de bioconversão.....	50
2.2.7 Teste de fonte de carbono utilizando $\alpha$ -pineno e limoneno .....	51
2.2.8 Efeito da indução enzimática na formação de produtos a partir de $\alpha$ -pineno pelas linhagens LBA1213 e LBA12111.....	51
2.2.9 Ensaio de bioconversão de $\alpha$ -pineno ou limoneno pelas linhagens LBA1213 e LBA12111 .....	51
2.2.10 Análise estatística .....	52

<b>2.3 Resultados e discussão .....</b>	<b>52</b>
<b>2.3.1 Isolamento de microrganismos de <i>Polygala fimbriata</i> e pré-seleção das linhagens bacterianas resistentes a 2% de <math>\alpha</math>-pineno ou limoneno.....</b>	<b>53</b>
<b>2.3.2 Teste de fonte de carbono e bioconversão de limoneno.....</b>	<b>54</b>
<b>2.3.3 Teste de fonte de carbono e bioconversão de <math>\alpha</math>-pineno .....</b>	<b>55</b>
2.3.3.1 Efeito da pré-adaptação de inóculo no crescimento microbiano e formação de produtos na bioconversão de $\alpha$ -pineno.....	56
<b>2.4 Conclusão.....</b>	<b>61</b>
<b>3 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO 3- OBTENÇÃO DE TERPINEÓIS A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DE <math>\alpha</math>- PINENO E LIMONENO POR LINHAGEM FÚNGICA ISOLADA DE <i>Eucalyptus</i> spp.....</b>	<b>67</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Introdução.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2 Material e métodos.....</b>	<b>69</b>
3.2.1 Reagentes e substratos .....	69
3.2.2 Isolamento de microrganismos de <i>Eucalyptus</i> spp.....	70
3.2.3 Teste de resistência e de fonte carbono utilizando $\alpha$ -pineno.....	70
3.2.4 Preparo de inóculo fúngico para ensaios fermentativos .....	71
3.2.5 Ensaio de bioconversão de monoterpenos .....	72
3.2.6 Efeito da indução enzimática na formação de terpineno-4-ol a partir de $\alpha$ -pineno ...	72
3.2.7 Influência da permeabilização celular na produção de terpineno-4-ol a partir de $\alpha$ -pineno .....	72
3.2.8 Adição de co-solventes ao sistema fermentativo .....	72
3.2.9 Análise do bioprocessos por cromatografia gasosa.....	73
3.2.10 Avaliação da extração de substrato e compostos formados durante a bioconversão com diferentes solventes.....	74
3.2.11 Análise morfológica das hifas do fungo LBA1323 na presença de $\alpha$ -pineno por microscopia ótica de varredura (MEV).....	74
3.2.12 Análise estatística dos dados.....	75
<b>3.3 Resultados e discussão .....</b>	<b>75</b>
3.3.1 Isolamento microrganismos de <i>Eucalyptus</i> spp e seleção de linhagens para bioconversão de $\alpha$ -pineno .....	75
3.3.2 Bioconversão de $\alpha$ -pineno pela linhagem fúngica LBA1323.....	77

<i>3.3.3 Efeito da indução enzimática na formação de terpineno-4-ol a partir de <math>\alpha</math>-pineno...</i>	<i>80</i>
<i>3.3.4 Análise da morfologia das hifas do fungo LBA1323 na presença de <math>\alpha</math>-pineno.....</i>	<i>82</i>
Neste caso, as alterações morfológicas nas hifas do fungo LBA1323 podem ser decorrentes tanto do efeito do $\alpha$ -pineno, substrato do processo, quanto do terpineno-4-ol, produto majoritário formado durante a biotransformação. ....	
	84
<i>3.3.5 Avaliação da extração de <math>\alpha</math>-pineno e terpineno-4-ol com diferentes solventes.....</i>	<i>84</i>
<i>3.3.6 Efeito da permeabilização celular na produção de terpineno-4-ol a partir de <math>\alpha</math>-pineno pelo fungo LBA1323.....</i>	<i>87</i>
<i>3.3.7 Efeito da adição de co-solvente no bioprocesso para a produção de terpineno-4-ol..</i>	<i>89</i>
<i>3.3.8 Bioconversão de limoneno a <math>\alpha</math>-terpineol pelo fungo LBA1323.....</i>	<i>91</i>
<b>3.4 Conclusão .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>99</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

Os aromas e fragrâncias são compostos orgânicos utilizados como aditivos em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, sendo responsáveis pela preferência e aceitação destes (HOSOGLU; GUNESER; YUCEER, 2018). Dentre os compostos de aroma, os mono- e sesquiterpenos destacam-se como os mais abundantes na natureza e também os principais constituintes de óleos essenciais, sendo amplamente utilizados nas indústrias supracitadas (AKACHA; GARGOURI, 2015). Estes compostos são metabólitos secundários de plantas, produzidos via síntese “*de novo*”, pelas rotas do mevalonato e metileritritol fosfato a partir dos precursores isopentil difosfato e pirofosfato de dimetilalilo, sendo formados quimicamente por unidades de isopreno ( $C_5$ ), e classificados de acordo com o número de carbonos (10 a 40) em monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ou carotenos ( $C_{40}$ ) (SCHEMPPP *et al.*, 2017).

A obtenção de compostos de aroma pode ocorrer por síntese química ou extração natural, métodos esses associados a uma série de limitações, tais como a produção de misturas racêmicas de produtos, utilização de condições de processo drásticas, baixa produtividade, dependência de fatores climáticos e políticos, dentre outros (FELIPE *et al.*, 2017). Paralelo a esses métodos, têm-se a produção por processos biotecnológicos, que atende aos princípios da “Química Verde”, tem melhor regio- e enantiosseletividade que a síntese química, possibilidade de utilização de subprodutos da indústria; fazendo deste uma alternativa de grande interesse do mercado consumidor e produtor (VESPERMANN *et al.*, 2017).

A síntese de compostos de aroma por processos biotecnológicos pode ocorrer através de dois processos distintos, a síntese “*de novo*”, onde a formação desses compostos dá-se a partir de substratos simples, como a glicose (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015). A rota de bioconversão e/ou biotransformação tem como material de partida moléculas precursoras bem específicas para cada tipo de produto, como o limoneno utilizado para a produção de  $\alpha$ -terpineol, por exemplo (PESSÔA *et al.*, 2019).

A abundância desses compostos na natureza e seu potencial bioativo associado tornam os terpenos grandes alvos de pesquisas científicas, dentre os quais, o  $\alpha$ -pineno e o limoneno são dois substratos amplamente utilizados em estudos de bioconversão (VESPERMANN *et al.*, 2017).

A biotransformação de monoterpenos de baixo custo, como o limoneno e o  $\alpha$ -pineno, para a produção de compostos de interesse comercial possui considerável potencial industrial, embora ainda seja considerada tecnicamente difícil, devido a algumas

características limitantes destes compostos quando utilizados como substratos em processos biológicos. Dentre essas características, pode-se citar sua baixa estabilidade química, que acarreta em auto-oxidação, isomerização *cis-trans*, reações de polimerização, ciclização e rearranjos moleculares (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997). Outra dificuldade relacionada à biotransformação é a toxicidade dos terpenos aos microrganismos, os quais em concentrações superiores a 70% podem resultar na inibição do crescimento pela lise celular (ABOLGHASEMI; HESHMATIPOUR; MEYBODI, 2013; VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997). O coeficiente de partição desses monoterpenos entre octanol e água (log P), 4,40 para o limoneno e 4,49 para o  $\alpha$ -pineno, também pode explicar a sua toxicidade, uma vez que valores de log P entre 1 e 5 são tóxicos às células vivas (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997).

Em decorrência do potencial industrial de derivados terpênicos e às limitações de sua produção em sistemas biológicos, muitas pesquisas têm se concentrado no isolamento, triagem e seleção de novos biocatalisadores capazes de produzir compostos de aromas a partir de substratos diversos (PESSÔA *et al.*, 2019). Assim, o isolamento de microrganismos robustos e o desenvolvimento de bioprocessos sob condições que favoreçam a bioconversão de substratos abundantes e de baixo custo, como o limoneno e o  $\alpha$ -pineno, tornam-se estratégias interessantes para a obtenção de produtos de valor agregado.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de bioprocessos para a bioconversão de monoterpenos utilizando microrganismos isolados de fontes vegetais.

## REFERÊNCIAS

- ABOLGHASEMI, Z.; HESHMATIPOUR, Z.; MEYBODI, M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms from citrus waste water of citrus processing plant of Kosarin Ramsar-Iran. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 11, p. 134–141, 2013.
- AKACHA, N. BEN; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. October, p. 675–706, 2015.
- FELIPE, L. DE O. *et al.* Bioaromas - Perspectives for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 141–153, 2017.
- GUPTA, C.; PRAKASH, D.; GUPTA, S. A Biotechnological Approach to Microbial Based Perfumes and Flavours. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2015.
- HOSOGLU, M. I.; GUNESER, O.; YUCEER, Y. K. Different Bioengineering Approaches on Production of Bioflavor Compounds. In: **Role of Materials Science in Food Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 37–71.
- PESSÔA, M. G. *et al.* Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 319–339, mar. 2019.
- SCHEMPP, F. M. *et al.* Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017.
- VAN DER WERF, M.; DE BONT, J.; LEAK, D. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 55, p. 147–177, 1997.
- VESPERMANN, K. A. C. *et al.* Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805–1817, 20 mar. 2017.





## CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO: DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS VISANDO A OBTENÇÃO DE BIOAROMAS

### RESUMO

O mercado de aditivos alimentares é uma parcela expressiva da indústria de alimentos processados, que vêm buscando, sob a pressão dos consumidores, a agregação de aditivos de origem natural em suas formulações. As limitações impostas pela obtenção via extração natural desses compostos, especialmente os de aromas, têm incentivado a produção por via biotecnológica. Neste âmbito a utilização de biocatalisadores eficientes pode tornar esses processos interessantes do ponto de vista industrial e econômico, deste modo a seleção de microrganismos de ambientes naturais surge como uma alternativa para a obtenção de tais biocatalisadores. Tal ferramenta é amplamente utilizada na seleção de biocatalisadores para a bioconversão de monoterpenos, que envolvem também a caracterização adequada do processo e a avaliação de parâmetros que forneçam maiores produtividades. A biotransformação de moléculas como o limoneno e o  $\alpha$ -pineno têm sido estudada com afinco, e propiciado a seleção de microrganismos e desenvolvimento de bioprocessos com possibilidades de aplicação em escala industrial. Dentre os vários microrganismos potenciais, o gênero *Bacillus* mostra-se promissor para a aplicação neste tipo de sistema, dados os frequentes relatos de sua utilização, especialmente na formação de vanilina. Apesar de muitas espécies desse gênero já terem sido utilizadas na bioconversão de ácido ferúlico,  $\alpha$ -pineno e limoneno, o *Bacillus mycoides* é ainda subexplorado nesse setor, apesar de seu enorme potencial catalítico em outras áreas.

Palavras-chave: Monoterpenos; Limoneno.  $\alpha$ -pineno. Biotransformação. *Bacillus spp.* *Bacillus mycoides*.

### 1.1 Introdução

Os aditivos alimentares são um importante setor da indústria de alimentos e bebidas, apresentando um mercado avaliado em US\$55 bilhões em 2017, uma importante fatia do enorme faturamento da indústria de alimentos processados (US\$2 trilhões em 2016). Esses compostos são adicionados em pequenas quantidades em vários produtos para melhorar e manter o seu frescor, contribuindo também para a melhoria do sabor, aroma, textura e aparência (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017).

Dentre os aditivos alimentares, temos o setor de aromas e fragrâncias com um mercado global estimado em US\$28,2 bilhões em 2017, dos quais 56% correspondentes aos aromas e 44% às fragrâncias. As principais aplicações desses produtos são as indústrias de bebidas e produtos lácteos para os aromas, e sabão e detergentes para as fragrâncias (IAL CONSULTANTS, 2018).

Notadamente importantes para a indústria alimentícia, este setor tem sido impactado pelo crescente interesse dos consumidores por produtos de denominação natural (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015). Neste sentido, as biotransformações microbianas têm se mostrado uma importante ferramenta para reduzir a produção química de vários compostos utilizados não só na indústria alimentícia, mas também nas farmacêuticas e agroquímicas (SMITHA; SINGH; SINGH, 2017). Tais biotransformações são definidas como o processo em que células microbianas são utilizadas para converter um composto orgânico em um composto estruturalmente correlato através de uma ou mais reações enzimáticas, um claro exemplo é a conversão de etanol a ácido acético por bactérias do gênero *Acetobacter* (PERKINS *et al.*, 2016).

Os processos conduzidos com microrganismos são muitas vezes preferíveis em função da diversidade metabólica existente e capacidade intrínseca de regeneração de cofatores, que propicia a modificação de uma variedade de moléculas orgânicas (PESSÔA *et al.*, 2019). Sendo assim, pode-se ressaltar a possibilidade de desenvolvimento de diversos novos processos para a síntese de várias biomoléculas com foco no biocatalisador a ser empregado, através do estudo da utilização de linhagens selvagens e desenvolvimento de cepas melhoradas por engenharia genética.

Na atual conjuntura, a exploração da diversidade microbiana de ambientes naturais, ambientes adversos ou de resíduos ricos em substratos específicos para a síntese de alguma biomolécula, é uma importante etapa para a descoberta de linhagens promissoras para a aplicação em processos biotecnológicos, dado o fato dos microrganismos utilizados atualmente em processos industriais terem derivado primariamente de isolamentos diversos.

## **1.2 Diversidade microbiana para a obtenção de biomoléculas**

A obtenção de novos microrganismos com possível aplicação em processos biotecnológicos é realizada corriqueiramente através de ensaios de bioprospecção, exploração e investigação da flora e fauna (DUARTE *et al.*, 2013). No caso especial de microrganismos utilizados na produção e/ou biotransformação de aromas, geralmente utiliza-se fontes vegetais

nos isolamentos (ALEU *et al.*, 2001; BICAS; PASTORE, 2007; BIER *et al.*, 2011; BOWEN, 1975; DEEPTHI PRIYA; PETKAR; CHOWDARY, 2014; ROTTAVA *et al.*, 2010b).

Esses microrganismos isolados de fontes vegetais podem ser divididos em endofíticos, os quais vivem no interior dos tecidos vegetais, e os epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (ABRAHÃO; MOLINA; PASTORE, 2013; AZEVEDO, 1998). Os endofíticos colonizam o interior dos tecidos vegetais sem lhes causar doenças, podendo inclusive auxiliar o hospedeiro no controle de doenças e pragas, ocasionar alterações fisiológicas, produzir toxinas, antibióticos, fatores de crescimento e diversas outras substâncias de interesse biotecnológico (AZEVEDO, 1998; POLLI *et al.*, 2013).

Os microrganismos endofíticos podem apresentar maior robustez em comparação com os epifíticos, decorrente de uma melhor adaptação ao ambiente fornecido pelo vegetal. Essa adaptação pode estar associada a alterações genéticas, como a troca de informações entre estes e o hospedeiro, bem como à capacidade de produção de compostos bioativos similares àqueles encontrados no hospedeiro, algo que poderia lhe tornar um potente agente de transformação de compostos (ABRAHÃO; MOLINA; PASTORE, 2013; PIMENTEL *et al.*, 2011).

A grande diversidade de espécies vegetais superiores disponível no planeta (cerca de 300.000), fazem das plantas um extenso campo de exploração para o isolamento de microrganismos (STROBEL *et al.*, 2004). A escolha da fonte de isolamento pode ser pautada em quatro fatores básicos: plantas oriundas de biomas únicos, plantas com história etnobotânica, plantas endêmicas com longevidade incomum e plantas de áreas de grande biodiversidade (STROBEL *et al.*, 2004). Neste último caso, é importante considerar que o Brasil abriga a maior biodiversidade de fauna e flora do planeta, possuindo 20% do total de espécies da Terra. A sua ampla extensão territorial possibilita ainda a presença de biomas distintos e únicos: a floresta tropical úmida da Floresta Amazônica, a planície inundável do Pantanal, as savanas e bosques do Cerrado, as florestas semiáridas da Caatinga, os campos dos Pampas, e a floresta tropical pluvial da Mata Atlântica (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017a).

Dentre estes podemos dar destaque à Mata Atlântica, um conjunto de florestas e ecossistemas associados, como restingas, manguezais e campos de altitude, que ocupava originalmente 1,3 milhões de km<sup>2</sup> do território brasileiro (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017b). Suas áreas remanescentes encontram-se distribuídas por 15 estados da federação: Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo,

Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (IESB, 2007).

A Mata Atlântica é uma das regiões mais biodiversas do mundo, abrigando cerca de 20.000 espécies vegetais ou 35% de todas as espécies existentes no Brasil, um número superior a continentes inteiros como a Europa e a América do Norte (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017b). Além da sua importância em termos de biodiversidade, também é a área que abriga boa parte da população brasileira (120 milhões de pessoas) e também é nesta região onde é gerado aproximadamente 70% do PIB nacional (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017b). Apesar da sua importância ambiental, cultural e até mesmo econômica, este bioma encontra-se seriamente ameaçado, restando apenas 22% da sua cobertura original em diferentes estágios de regeneração e com apenas 8,5% conservados em áreas superiores a 100 hectares (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017b).

A conservação dessa biodiversidade traz benefícios incalculáveis para a manutenção da sustentabilidade ambiental, disponibilidade de recursos naturais, sustentação e popularização das culturais locais. Neste contexto, o conhecimento da biodiversidade microbiana associada a este bioma pode reforçar o interesse da comunidade local e internacional na manutenção da Mata Atlântica remanescente, além de poder ser a origem de biocatalisadores de grande potencial de aplicação em processos biotecnológicos.

### 1.3 Obtenção de terpenos

Os terpenos são moléculas formadas quimicamente por unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), e classificados de acordo com o número de carbonos (10 a 40) em monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ) e tetraterpenos ou carotenos ( $C_{40}$ ) (SCHEMPP *et al.*, 2017). Os terpenóides são sintetizados via síntese “*de novo*” a partir de duas vias metabólicas: a via do mevalonato (MEV), predominante em leveduras e mamíferos, e a via do metileritritol-fosfato (MEP), funcional na maioria das plantas e microrganismos (HESS *et al.*, 2013).

Do ponto de vista comercial, os terpenos, especialmente mono- e sesquiterpenos, podem ser obtidos por extração natural a partir de vegetais superiores, por síntese química ou por produção biotecnológica. A síntese natural destes compostos é parte do metabolismo de vegetais superiores, que os sintetizam como metabólitos secundários, podendo atuar no mecanismo de defesa das plantas contra pragas e insetos e como atrativos para os polinizadores (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2006). Este é um método tradicional para a

obtenção de moléculas de alto agregado, contudo dada a baixa concentração destes nos vegetais e susceptibilidade a variações sazonais, políticas e climáticas, os torna compostos substancialmente onerosos e de baixa disponibilidade no mercado (SALES *et al.*, 2018).

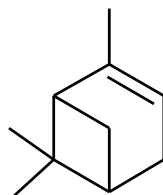
De outro lado, a síntese química garante a produção em larga escala destes compostos a preços acessíveis, contudo tem atrelado a si a formação de misturas racêmicas de produtos e a utilização de condições severas de processo, como altas temperaturas (VESPERMANN *et al.*, 2017). A produção biotecnológica de terpenos supre lacunas de ambos os métodos, como a produção de aromas naturais com alta regio- e enantiosseletividade, possibilidade de produção durante todo o ano, adoção de parâmetros de processos brandos e operação de com condições de processo controláveis e passíveis de otimização (FELIPE *et al.*, 2017).

A produção biotecnológica de derivados terpênicos ocorre através de um processo denominado biotransformação, que consiste na adição de precursores ao meio de cultivo, induzindo o microrganismo a adotar uma rota metabólica específica que resulta na formação de produtos específicos (VESPERMANN *et al.*, 2017), ou por síntese “*de novo*”, onde a formação desses compostos dá-se a partir de substratos simples, como a glicose (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015).

A abundância dos compostos terpênicos na natureza, e sua presença em subprodutos e resíduos agroindustriais, como o óleo de casca de laranja e a terebentina, e o potencial bioativo associado tornam os terpenos grandes alvos de pesquisas científicas, dentre os quais, o  $\alpha$ -pineno e o limoneno são dois substratos amplamente utilizados em estudos de bioconversão (PESSÔA *et al.*, 2019).

### ***1.3.1 Pinenos como substratos em processos de bioconversão***

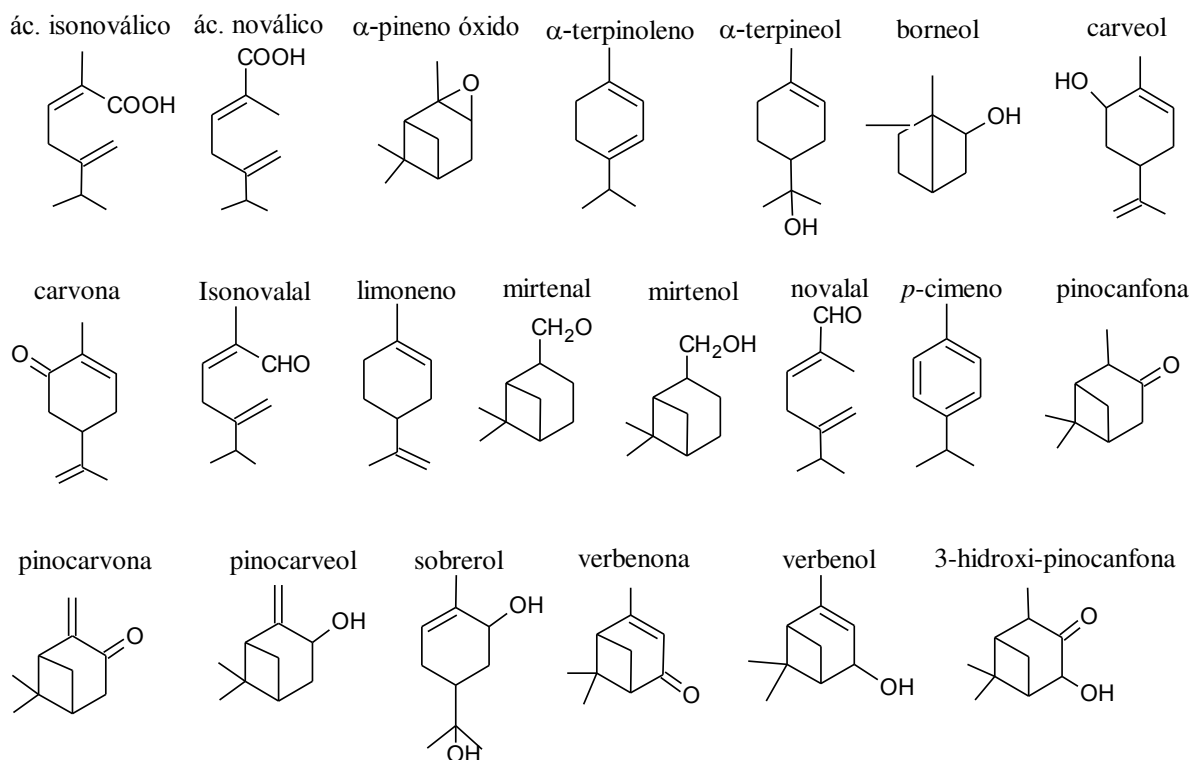
O  $\alpha$ -pineno (Figura 1) é um líquido incolor, com gosto característico intenso, silvestre e de pinho com notas de cânfora e terebentina até um limiar de 10 ppm, enquanto seu aroma é predominantemente cítrico, picante, de pinho silvestre e de terebentina (BURDOCK, 2010). A presença do  $\alpha$ -pineno já foi reportada em pelo menos 400 óleos essenciais (BERGER, 2007) e sua produção pode ser realizada pela extração dos óleos ou através da destilação da terebentina (BURDOCK, 2010).

**Figura 1** - Estrutura química do  $\alpha$ -pineno.

O  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno representam de 75% a 90% da constituição de óleo essencial de coníferas e podem ser encontrados também na terebentina, um subproduto da indústria de papel e celulose (LINDMARK-HENRIKSSON, 2003; YOO; DAY, 2002). Esses compostos são os monoterpenos bicíclicos mais abundantes na natureza e podem ser precursores de compostos de aroma amplamente utilizados na indústria de cosméticos e alimentícia, como  $\alpha$ -terpineol, verbenol e verbenona (BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009).

Os pinenos apresentam limitações de utilização em sistemas biológicos, dada a sua baixa solubilidade em água e seu potencial destrutivo de membranas celulares de eucariotos e procariotos (SAVITHIRY *et al.*, 1998). Apesar disso, já foi relatado a formação de vários produtos através de processos de bioconversão, cujas estruturas estão demonstradas na Figura 2.

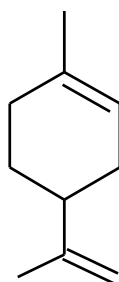
Um panorama geral do uso de  $\alpha$ - e/ou  $\beta$ -pineno em estudos de biotransformação a produtos de valor agregado é descrito por Vespermann e colaboradores (2017), dentre os quais pode-se dar destaque aos trabalhos desenvolvidos por Rottava e colaboradores (2010) na produção de 15,5 g/L de  $\alpha$ -terpineol a partir de  $\beta$ -pineno com culturas de *Aspergillus niger*; Trytek Jedrzejewski e Fiedurek (2015) na produção de 1,3 g/L de verbenol e verbenona a partir  $\alpha$ -pineno com culturas de *Chrysosporium pannorum*; Fontanille e Larroche (2003) na produção de 16 g/L de isonovalal a partir de  $\alpha$ -pineno com culturas de *Pseudomonas rhodesiae*.

**Figura 2** - Principais formados a partir da biotransformação de  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno.

**Fonte:** Adaptado de Vespermann *et al.* (2017).

### 1.3.2 Limoneno como substrato em processo de bioconversão

O limoneno (Figura 3) é um monoterpene cíclico com duas formas isoméricas (*D*- e *L*-) com aromas ligeiramente distintos, onde sua forma *D*- possui aroma típico de laranja e a *L*- de terebentina, com limiares de detecção de 30 ppm (BURDOCK, 2010; NEGRO *et al.*, 2016). Pode ser encontrado no óleo essencial de pelo menos 300 espécies vegetais distintas, porém ocorre em maiores concentrações em frutas cítricas (laranja, lima e limão), com maior recorrência do *D*-limoneno em concentrações de até 96% (BURDOCK, 2010; MARÓSTICA; PASTORE, 2007).

**Figura 3** - Estrutura química do limoneno.

O *D*-limoneno é o principal composto estudado em processos de bioconversão, devido à sua abundância, baixo custo e similaridade com derivados oxigenados de alto valor agregado, como o terpineol, carveol, carvona e álcool perílico (BICAS *et al.*, 2010a).

As principais rotas metabólicas envolvidas e biocatalizadores utilizados na bioconversão de limoneno são descritas por Maróstica e Pastore (2007) e Duetz e colaboradores (2003), destacando-se a produção de 4 g/L de  $\alpha$ -terpineol e 3,7 g/L de limoneno-1,2-diol por *Fusarium oxysporum* (MOLINA *et al.*, 2015), a produção de 130 g/L de  $\alpha$ -terpineol por *Sphingobium* sp. em sistema bifásico (BICAS *et al.*, 2010b) e 31 g/L de ácido perílico por *Pseudomonas putida* DSM 12264 (MIRATA; HEERD; SCHRADER, 2009).

#### 1.4 Gênero *Bacillus* como biocatalisador em processos biotecnológicos

O gênero *Bacillus* consiste num grupo de bactérias Gram-positivas em formato de bastonete, formadores de endósporos, aeróbicos e que geralmente produzem catalase (JENSON, 2014a). Este gênero engloba mais de 140 espécies, as quais são comuns na natureza, podendo ser isoladas de ambientes diversos, como: alimentos, solo, água, animais e plantas. Embora, a maioria dos *Bacillus* cresça em temperaturas entre 20 e 40°C, pH neutros e baixas concentrações de sais, devido a diversidade desse gênero, algumas espécies se desenvolvem em temperaturas acima de 50°C, em ambientes com pH ácidos ou em altas concentrações de sais (JENSON, 2014b).

Espécies de *Bacillus* têm se tornando organismos modelo para aplicação na indústria e em estudos acadêmicos, atribuídas primariamente à sua estabilidade genética (MOHAPATRA *et al.*, 2017). Além disso, o bom crescimento em fontes de carbono baratas (como a glicose, por exemplo), metabolismo endógeno distinto e robustez em processos fermentativos industriais, além da sua capacidade superior de secreção de proteínas, tornaram as espécies de *Bacillus* biocatalisadores interessantes para a produção industrial de uma variedade de produtos, que podem incluir biopolímeros e proteínas (GU *et al.*, 2018). Este gênero tem sido bem estudado para produção de biosurfactantes, que incluem surfactinas, fengicinas, liquenisinas e bacilomicina (GIRI *et al.*, 2019), biopolímeros como os polihidroxialcanoatos (PHA's) (MOHAPATRA *et al.*, 2017) e também na biossíntese de lipases (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2011), por exemplo.



#### **1.4.1 Versatilidade de linhagens de *Bacillus* na produção de bioaromas**

Linhagens do gênero *Bacillus* possuem naturalmente mais genes e proteínas envolvidos nas rotas de síntese de isoprenóides em comparação com outros microrganismos. A melhor representação deste fato é o *Bacillus subtilis*, que apresenta 15 enzimas pertencentes a cinco vias de síntese de isoprenos, que incluem a via mevalonato, a via do metileritritol-fosfato, a via de biossíntese do esqueleto terpenóide, via de biossíntese dos carotenoides e ubiquinona (GUAN *et al.*, 2015).

O uso de *Bacillus subtilis* tem sido sugerido como modelo para estudo da síntese de isoprenóides, dado o fato da formação desses compostos por esse microrganismo ser predominantemente pela via metileritritol-fosfato, tal qual nos sistemas vegetais (WAGNER; HELMIG; FALL, 2000). Ademais, uma regulação positiva dessa via em *B. subtilis* pode resultar num organismo hospedeiro interessante para a produção de compostos terpênicos complexos, como a artemisina (JULSING *et al.*, 2007). Estes fatos têm levado diversos pesquisadores a tentar elucidar e explorar todo o potencial desse *Bacillus* como hospedeiro (GU *et al.*, 2018; HESS *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017). Além disso, espécies do gênero *Bacillus* têm um histórico de uso na elaboração de produtos alimentícios fermentados tradicionais, como condimentos e molhos produzidos a partir de grãos, legumes e frutos do mar (TORRES *et al.*, 2009).

O potencial endógeno desse Gênero também o torna alvo de isolamentos para a utilização na produção de bioaromas, deste modo alguns relatos da utilização de linhagens selvagens de *Bacillus* na produção de bioaromas serão descritos a seguir (Tabela 1), e demonstradas as peculiaridades dos sistemas que propiciaram melhores produções.

A maioria dos relatos de conversão de terpenos por linhagens de *Bacillus* estão voltados para a produção de vanilina, o principal composto de aroma comercializado atualmente, com um volume de mercado de US\$600 milhões (PESSÔA *et al.*, 2019). Tal fato é evidenciado por vários relatos que sugerem a utilização de células em crescimento de *Bacillus* spp. para a conversão de ácido ferúlico ou isoeugenol a vanilina (HUA *et al.*, 2007; KARMAKAR *et al.*, 2000; SHIMONI; RAVID; SHOHAM, 2000).

A viabilidade celular de *B. subtilis* em ensaios de bioconversão com células em repouso foi severamente reduzida dada a toxicidade do isoeugenol, contudo a utilização de extrato livre de células ou células em crescimento possibilitaram a formação de 900 mg/L e (610 mg/L de vanilina, respectivamente (SHIMONI; RAVID; SHOHAM, 2000). Karmakar e colaboradores (2000) demonstraram que a suplementação do meio com extrato de levedura

favoreceu a degradação de ácido ferúlico a vanilina por *Bacillus coagulans*. Em contrapartida, o uso de células em repouso de *Bacillus safensis* SMS1003 foram mais eficientes na conversão de eugenol a vanilina sob condições otimizadas, e a utilização de células foi preferencial ao uso de extrato enzimático livre de células (SINGH; MUKHOPADHYAY; GHOSH SACHAN, 2018), demonstrando que o substrato utilizado, e sua toxicidade, influenciam diretamente no bioprocesso.

O uso de estratégias de seleção adequada das condições de processo também se mostram eficientes para melhorar a produção de vanilina por linhagens selvagens, como na utilização de *Bacillus aryabhattai* cultivado sob condições otimizadas para a produção de 40 mg/L de vanilina, com posterior avaliação de operação do sistema em batelada alimentada aumentando a produção para 147 mg/L (PAZ *et al.*, 2016, 2018). Enquanto a redução da inibição por produto utilizando resina HD-8 para adsorção acarretou em concentrações interessantes de vanilina (8,10 g/L) produzidas por *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 (ZHAO *et al.*, 2006). Neste mesmo âmbito, a operação em reator agitado com leito empacotado lateral com células imobilizadas de *Bacillus subtilis* mostraram-se mais efetivas do que a utilização de células livres (CHEN *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2016). Alguns relatos também descrevem a produção de pequenas quantidades de verbenol por linhagens selvagens de *Bacillus cereus* e *Bacillus spp.*, nestes casos temos a utilização do mesmo substrato ( $\alpha$ -pineno) para a formação do mesmo produto (verbenol), entretanto verifica-se a operação com células em crescimento (*B. cereus*) e células em repouso (*B. spp.*) (BRAND *et al.*, 1975; ROTTAVA *et al.*, 2010b).

A aplicação de técnicas e linhagens diferentes também propiciaram a conversão de limoneno a derivados interessantes, como carvona, álcool perílico e  $\alpha$ -terpineol. Tais técnicas incluem a utilização de linhagem termófila cultivada com a suplementação com extrato de leveduras para melhorar a conversão (CHANG; ORIEL, 1994), operação em sistema bifásico (SAVITHIRY *et al.*, 1998) e aplicação de ferramentas estatísticas de otimização de processo atrelada à indução enzimática (PAULINO, 2014).

Neste contexto, pode-se verificar o potencial de aplicação de *Bacillus* na conversão de monoterpenos, observando que muitas vezes a utilização de células em crescimento é preferencial para se alcançar a conversão dos substratos. Ressalta-se também a grande variabilidade das espécies utilizadas, o que abre campo para a exploração de outras linhagens de *Bacillus* como biocatalisadores para a conversão de monoterpenos.

**Tabela 1** – Produção de bioaromas por linhagens de *Bacillus* sp.

Microrganismo	Substrato	Produto	Condições de processo	Referência
<i>Bacillus cereus</i>	$\alpha$ -pineno	<i>Cis</i> - e <i>trans</i> -verbenol	1% de substrato	Brand <i>et al.</i> , (1975)
4 linhagens de <i>Bacillus</i> sp.	$\alpha$ -pineno	Verbenol (40,85-60,30 mg/L)	8 dias, 150 rp, 30°C, 1,5% de substrato	Rottava <i>et al.</i> , (2010b)
<i>Bacillus pallidus</i> BR425	$\alpha$ -pineno	Carveol, carvona, pinocarveol, pinocarvona, mirtenol e mirtenal	50°C, 72 h, fase aquosa sob agitação, meio mínimo M9; pH 7.4, 15 mM de substrato	Savithiry <i>et al.</i> , (1998)
<i>Bacillus pallidus</i> BR425	$\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno	Carveol, pinocarveol, pinocarvona, mirtenol e mirtenal	50°C, pH 7, 24 h, sistema bifásico sob agitação	
<i>Bacillus pallidus</i> BR425	Limoneno	Carveol, carvona e $\alpha$ -terpineol		
<i>Bacillus tequilensis</i>	Limoneno	$\alpha$ -terpineol (85 mg/L)	Sob condições otimizadas: meio mineral, DO 6, 30°C, 1% de substrato e 250 rpm.	Paulino (2014)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> BR388	Limoneno	Álcool perfílico (200 $\mu$ g/mL), $\alpha$ -terpineol e aldeído perfílico	55°C sob agitação, suplementação com extrato de levedura	(Chang e Oriel 1994)
<i>Bacillus coagulans</i>	Ácido ferúlico	4-vinilguaiacol, vanilina, ácido vanílico e ácido protocatecuico	7 h, 37°C, 180 rpm, meio mínimo M9, 0,1% de substrato	Karmakar <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus subtilis</i>	Isoeugenol	Vanilina (900 mg/L)	Extrato livre de células, 30°C, 150 rpm, 1% de substrato, 48 h	(Shimoni; Ravid e Shoham (2000)
<i>Bacillus fusiformis</i> CGMCC1347	Isoeugenol	Vanilina (8,10 g/L)	pH 7, 37°C, 180 rpm, 72 h, adsorção em resina HD-8	Zhao <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus pumilus</i>	Isoeugenol	Vanilina (3,75 g/L)	150 h, 200 rpm, 30°C	Hua <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus aryabhattai</i>	Ácido ferúlico	Vanilina (40 mg/L)	Sob condições ótimas ~pH 8, 40°C, 150 rpm	Paz <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus aryabhattai</i>	Ácido ferúlico	Vanilina (147 mg/L)	216 h, batelada alimentada	Paz <i>et al.</i> (2018)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ácido ferúlico	Vanilina (0,047 g/L.h)	Sob condições ótimas 20 h, 35°C, pH 9, 200 rpm	Yan <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ácido ferúlico	Vanilina (~890 mg/L)	Sob condições ótimas 20 h, 35°C, 220 rpm	Chen <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus safensis</i> SMS1003	Eugenol	Vanilina (120 mg/L)	96 h, sob condições otimizadas: 500 mg/L de substrato, pH 7, 37°C, 4% de inóculo e 180 rpm	Singh; Mukhopadhyay e Ghoshsachan (2018)

#### 1.4.2 Potencial biocatalítico de *Bacillus mycoides*

*Bacillus mycoides* é uma bactéria Gram positiva pertencente ao grupo do *Bacillus cereus*, que apresenta um crescimento rizoidal, que a distingue de outras bactérias do mesmo grupo (JENSON, 2014a). Além do seu particular crescimento rizoidal, outra peculiaridade dessa linhagem de *Bacillus* é a diferenciação da direção da curvatura dos seus filamentos quando cultivadas em meio sólido, que podem ser para a direita (DX) ou esquerda (SIN). Além da diferença morfológica, Di Franco e colaboradores (2002) reportaram um efeito

bactericida de temperaturas acima de 38°C para uma cepa selvagem de *Bacillus mycoides* dextrógiro (DX), enquanto a cepa levógiro (SIN) foi capaz de sobreviver até 42°C. Além disso, uma análise da sequência de aminoácidos de 4 genes (*ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ* e *murC*) dessas duas variantes mostraram um espaçamento muito mais longo entre os genes *ftsZ* e *murC* na estirpe SIN, indicando, que embora sejam similares, estas duas linhagens não são idênticas, o que pode explicar a diferença na resistência à temperatura e/ou direção da curvatura dos filamentos (DI FRANCO *et al.*, 2002, 2005).

*Bacillus mycoides* encontra-se comumente associado à rizosfera de plantas, podendo colonizar as superfícies radiculares formando uma matriz similar a um biofilme, enquanto algumas cepas são capazes de penetrar em tecidos radiculares e atuar como endofíticos, podendo produzir metabólitos que favoreçam o crescimento da planta e/ou atuem no controle de pragas e doenças (YI *et al.*, 2018). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado potencial dessa bactéria como agente de controle biológico contra pragas e doenças em plantas, indicando seu potencial para aplicação na agricultura e controle biológico.

Em experimentos em campo e em estufa, esta cepa mostrou-se capaz de reduzir de 38 a 91% da mancha foliar causada por *Cercospora beticola* Sacc. em beterraba sacarina, tal efeito está associado a uma indução da resistência sistêmica na planta em decorrência da produção de quitinase, 1,3-glucanase e peroxidase (BARGABUS *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* demonstraram o efeito antagônico de *B. mycoides* contra fungos patogênicos causadores de podridão radicular no feijão (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Sclerotium rolfsii*), possivelmente associado à produção de ácido indolacético (46 µg/mL), giberelinas (113 µg/mL) e sideróforos, além da secreção de enzimas antifúngicas, como proteases (33 U/mL) e quitinases (3,37 U/mL) (GHAZAL *et al.*, 2013). Bach e colaboradores (2016) também demonstraram o potencial de agente de controle biológico de uma linhagem de *B. mycoides* B38V isolada da rizosfera de girassol, através do efeito competitivo com linhagens de *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* spp., associados com a produção de celulasas, quitinases, esterases e proteases.

Huang e colaboradores (2018) demonstraram que compostos voláteis (dissulfeto de metila e amônia) produzidos por linhagens de *B. mycoides* isoladas de rizosfera de tomate inibiram o crescimento radial (>90%) de *Rhizoctonia solani* Kühn e *Pythium aphanidermatum* em ensaios *in vitro*, responsáveis pela doença do tombamento. Além disso, a aplicação de suspensão celular de *B. mycoides* no meio de cultivo promoveu o crescimento de 5 espécies vegetais (aspargo, repolho, tomate, alface e canola), além de se verificar a redução

da incidência de tombamento induzida por *Pythium aphanidermatum* em até 45% (HUANG *et al.*, 2018).

Uma linhagem selvagem de *B. mycoides* isolada da endosfera de batata mostrou-se eficiente no aumento da biomassa vegetal e produção de clorofila de repolho chinês, resultados possivelmente atrelados à produção de sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular capazes de quelar íons de ferro, facilitando assim a solubilização e entrada desses íons nos tecidos, além de reduzir a biodisponibilidade deste para microrganismos fitopatógenos (YI *et al.*, 2018).

O efeito contra pragas já foi verificado para a linhagem *B. mycoides* R2, isolada do solo rizosférico de tomates, a qual exibiu elevada atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita*, com 90,94% de controle, além de 98,11% de morte ao se utilizar o caldo fermentado bruto de *B. mycoides*, provavelmente associado à produção de estireno (0,05 mMol/L) (LUO *et al.*, 2018). O efeito ectoparasita sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* enfatiza o potencial de *B. mycoides* B16 como agente de controle biológico, neste caso a morte da alga ocorreu pela lise celular e foto-inibição causada pelo sombreamento de células induzidos pela presença da linhagem bacteriana (GUMBO *et al.*, 2014; GUMBO; CLOETE, 2011).

Dadas as atividades enzimáticas comumente relatadas para *B. mycoides*, alguns estudos também avaliaram o potencial de aplicação dessa linhagem como probiótico em ração animal. Andriani e colaboradores (2017) sugerem a utilização desta linhagem para a produção de ração de peixes e camarões, dada a sua alta atividade celulolítica (3506 U/mL) e amilolítica (3730 U/mL). Neste mesmo campo, a suplementação da dieta com *B. mycoides* melhorou a morfologia intestinal, aumentou a densidade de bactérias no intestino e um hepatopâncreas mais pesado (indicando melhor atividade enzimática) em lagosta marrom (*Cherax cainii*) (AMBAS, 2015).

A atividade enzimática de *Bacillus mycoides* também foi relevante para a produção de quitoooligomêros, que são compostos bioativos com atividade antioxidante e anti-inflamatórias, derivados de “squid pen powder” através da utilização de uma quitosanase de *B. mycoides* TKUO3 estável em ampla faixa de pH e temperatura, demonstrando seu potencial para a agregação de valor de resíduos industriais (LIANG *et al.*, 2016). Além disso, há relato da produção de protease alcalina (54 U/mL), a qual é termoestável, com atuação ótima entre 50 e 55°C (ABDEL-NABY *et al.*, 1998).

O uso em biorremediação ambiental, já foi demonstrado pela remoção de 88% da dinamite de resíduos ricos neste contaminante por *B. mycoides* isolado de um consórcio de

bactérias redutoras de ferro, este estudo também mostrou que tanto sistemas aeróbicos (93% de degradação após 16 h) como anaeróbicos (94% de degradação após 24 h) podem ser utilizados nos processos de biorremediação (LIN; YU; CHEN, 2013). Em outro estudo, Lin e colaboradores (2013) mostraram que uma remoção de 99,5% de TNT pode ser alcançada através da imobilização de *B. mycoides* numa mistura de caolin (2,5%), álcool polivinílico (10%) e alginato de sódio (0,3%), com possibilidade de reuso por até 12 vezes. Alcançando 92,6% de redução da concentração de dinamite em águas residuárias após 8 h, indicando o grande potencial de aplicação para o tratamento de resíduos ricos em dinamite.

Há também a proposta de bioessolubilização de carvão marrom para uma posterior aplicação na geração de energia utilizando *B. mycoides* NS1020, neste estudo verificou-se aproximadamente 36% e 86% de solubilização do carvão marrom bruto e pré-tratado com ácido nítrico após 14 dias, respectivamente. Estes resultados são notadamente superiores a resultados médios da literatura para linhagens fúngicas, de 25% de solubilização após 4 semanas (ROMANOWSKA; STRZELECKI; BIELECKI, 2015). Além disso, Juzeliunas e colaboradores (2006) verificaram o efeito protetivo de *B. mycoides* isolado de amostras de metais expostas ao ambiente na inibição da corrosão de amostras de alumínio.

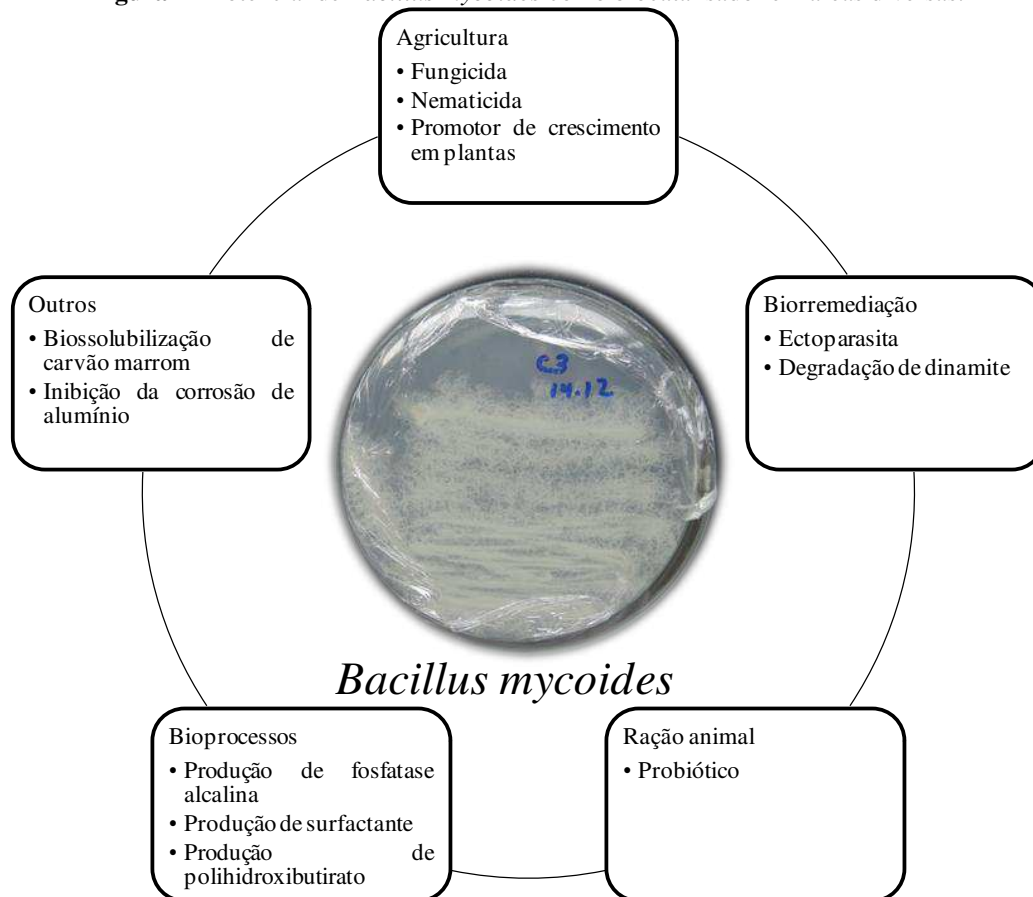
Essa linhagem também vem sendo estudada quanto ao seu potencial para a produção de biomoléculas em processos fermentativos, como na síntese de surfactantes e polihidroxibutirato (PHB), mostrando o potencial dessa bactéria para substituição da utilização de derivados de petróleo. Tal fato já foi demonstrado pela utilização de uma cepa de *B. mycoides* isolada de um campo de petróleo na produção de biossurfactante, com redução da tensão superficial em até 34 mN/m após 14 h de incubação, sob condições otimizadas (16,55 g/L de glicose, 39,03°C, 55,05 g/L de sais e pH de 7,37) (NAJAFI *et al.*, 2010). O biossurfactante produzido, um derivado lipopeptídico, foi aplicado na recuperação melhorada de petróleo (MEOR), com uma eficiência de extração de 31% (NAJAFI *et al.*, 2015).

Da mesma forma, a utilização de ferramentas estatísticas também foi utilizada para otimizar a produção de PHB, um poliéster biodegradável, por *Bacillus mycoides* DFC1, alcançando-se máxima produção (4,45 g/L) com 17,34 g/L de glicose, 7,03 g/L de peptona e pH 7,3 (NARAYANAN; RAMANA, 2012).

Os estudos descritos anteriormente demonstram o extenso potencial de aplicação de *B. mycoides*, em áreas que vão da agricultura, biorremediação, alimentação animal à produção de biomoléculas, cuja aplicação têm sido influenciada pela fonte de isolamento da cepa (Figura 4). Apesar disso, não foram encontrados relatos que descrevam a utilização deste em processos de bioconversão de aromas, muito embora tal linhagem tenha se mostrado

eficaz na degradação de moléculas complexas como dinamite e na recuperação melhorada de petróleo, deixando este campo de estudo em aberto.

**Figura 4** - Potencial de *Bacillus mycoides* como biocatalisador em áreas diversas.



## 1.5 Conclusão

A produção de biomoléculas denominadas naturais tem sido incentivada nas últimas décadas pela crescente preocupação dos consumidores por hábitos de vida saudáveis. A produção por extração natural é incapaz de acompanhar esse crescimento, tornando a produção por via biotecnológica uma alternativa promissora. Em face destes fatos, o desenvolvimento de processos industrialmente interessantes requer a busca por catalisadores eficientes, os quais podem ser obtidos através do isolamento e seleção de linhagens de ambientes naturais. Arelado a isto há também um estímulo à preservação de ambientes ricos em biodiversidade microbiana, vegetal e animal, como a Mata Atlântica.

Um setor altamente beneficiado por esse estímulo é o de aromas e fragrâncias, que passa a ter a possibilidade de síntese de compostos com alta enantio- e regioseletividade por

processos que seguem os princípios da “Química Verde”. Com isso, a possibilidade de utilização de produtos bioativos e industrialmente interessantes, como os monoterpenos, expande ainda mais o potencial desse mercado. Assim sendo, a conversão de terpenóides como o limoneno e  $\alpha$ -pineno, derivados de subprodutos industriais, à moléculas de maior valor agregado têm sido exaustivamente estudados, de modo a desenvolver processos passíveis de escalonamento industrial.

Neste âmbito, estudos com catalisadores como os *Bacillus*, que apresentam alta capacidade de secreção de proteínas e robustez quando aplicados em processos industriais vêm sendo conduzidos face ao grande potencial de desenvolvimento de tecnologias para a produção de biomoléculas. Apesar disso, há ainda campos inexplorados na área da produção de bioaromas com linhagens de *Bacillus*, como na utilização de *Bacillus mycoides*, um microrganismo com potencial catalítico demonstrado em diversos outros setores.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-NABY, M. A. et al. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 205–210, 1998.
- ABRAHÃO, M. R. E.; MOLINA, G.; PASTORE, G. M. Endophytes : Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 367–372, 2013.
- ALEU, J. et al. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid patchoulol, ginsenosol, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 11, p. 329–334, 2001.
- AMBAS, I. *Bacillus mycoides* improves health of gastrointestinal tract in marron (*Cherax cainii*, Austin 2002). **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, v. 2, n. 2, 25 abr. 2015.
- ANDRIANI, Y. et al. Characterization of *Bacillus megaterium* and *Bacillus mycoides* Bacteria as Probiotic Bacteria in Fish and Shrimp Feed. **KnE Life Sciences**, v. 2, n. 6, p. 127, 2017.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: **Microrganismos endofíticos**. [s.l.] Embrapa-CNPMA, 1998. p. 488.
- BACH, E. et al. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 99, p. 141–149, 2016.
- BARGABUS, R. L. et al. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, n. 5, p. 289–298, 2002.
- BERGER, R. G. **Flavours and Fragrances - Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.
- BICAS, J. L. et al. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 7–18, 2010a.
- BICAS, J. L. et al. A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+)- $\alpha$ -terpineol from R-(+)-limonene. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 481–486, 2010b.
- BICAS, J. L.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of terpenes: An approach for the flavor Industry. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4518–4531, 2009.
- BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 563–567, 2007.
- BIER, M. C. J. et al. Isolation and screening of microorganisms with potential for biotransformation of terpenic substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1019–1026, 2011.

- BOWEN, E. R. Potential by-products from microbial transformation of D-limonene. **Florida State Horticultural Society**, p. 304–308, 1975.
- BRAND, J. M. et al. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. **Nature**, v. 254, n. 5496, p. 136–137, 16 mar. 1975.
- BURDOCK, G. A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 6nd. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010.
- CHANG, H. C.; ORIEL, P. Bioproduction of Perillyl Alcohol and Related Monoterpenes by Isolates of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 3, p. 660–662, maio 1994.
- CHEN, P. et al. Optimizing bioconversion of ferulic acid to vanillin by *Bacillus subtilis* in the stirred packed reactor using Box-Behnken design and desirability function. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 143–152, 2017.
- DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 134–142, 2006.
- DEEPTHI PRIYA, K.; PETKAR, M.; CHOWDARY, G. V. Isolation , screening and identification of terpene resistant microorganisms from decayed yellow orange citrus fruits. **Research and Reviews : Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 12–21, 2014.
- DI FRANCO, C. et al. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. **BMC microbiology**, v. 2, p. 33, 13 nov. 2002.
- DI FRANCO, C. et al. Insights into the genetic organization of the *Bacillus mycoides* cryptic plasmids *pDx14.2* and *pSin9.7* deduced from their complete nucleotide sequence. **Plasmid**, v. 54, n. 3, p. 288–293, 2005.
- DUARTE, S. H. et al. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 377–381, 2013.
- DUETZ, W. A et al. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 4, p. 269–277, 2003.
- FELIPE, L. DE O. et al. Bioaromas - Perspectives for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 141–153, 2017.
- FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Optimization of isonovalal production from  $\alpha$ -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 534–540, jan. 2003.
- GHAZAL, M. F. et al. The use of *Bacillus mycoides* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents for the fungi causing root rot disease in common bean. **Egypt Journal of Biotechnology**, v. 44, n. June, 2013.
- GIRI, S. S. et al. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants

isolated from *Bacillus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 66–72, jul. 2019.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Food additives market size**. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/food-additives-market-size>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

GU, Y. et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 109–121, nov. 2018.

GUAN, Z. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for terpenoid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 22, p. 9395–9406, 2015.

GUMBO, J. R. et al. The viability assessment of *Microcystis aeruginosa* cells after co-culturing with *Bacillus mycoides* B16 using flow cytometry. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 72, p. 24–33, 2014.

GUMBO, J. R.; CLOETE, T. E. The mechanism of *Microcystis aeruginosa* death upon exposure to *Bacillus mycoides*. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 36, n. 14–15, p. 881–886, 2011.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 1–21, jan. 2011.

GUPTA, C.; PRAKASH, D.; GUPTA, S. A Biotechnological Approach to Microbial Based Perfumes and Flavours. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2015.

HESS, B. M. et al. Coregulation of Terpenoid Pathway Genes and Prediction of Isoprene Production in *Bacillus subtilis* Using Transcriptomics. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

HUA, D. et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 463–470, jul. 2007.

HUANG, J.-S. et al. Suppressive efficacy of volatile compounds produced by *Bacillus mycoides* on damping-off pathogens of cabbage seedlings. **The Journal of Agricultural Science**, v. 156, n. 6, p. 795–809, 24 ago. 2018.

IAL CONSULTANTS. **An Overview of the Global Flavours & Fragrances Market, 11th Edition**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.ialconsultants.com/uploads/CUBE\\_press\\_release/2018-08-02/FF\\_PressRelease\\_2018.pdf](http://www.ialconsultants.com/uploads/CUBE_press_release/2018-08-02/FF_PressRelease_2018.pdf)>. Acesso em: 20 maio. 2019.

IESB. **Levantamento da cobertura vegetal nativa do bioma Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <[http://mapas.mma.gov.br/geodados/brasil/vegetacao/vegetacao2002/mata\\_atlantica/documentos/relatorio\\_final.pdf](http://mapas.mma.gov.br/geodados/brasil/vegetacao/vegetacao2002/mata_atlantica/documentos/relatorio_final.pdf)>.

JENSON, I. BACILLUS | Detection by Classical Cultural Techniques. In: **Encyclopedia of**

**Food Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2014a. v. 1p. 135–143.

JENSON, I. BACILLUS | Introduction. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2014b. v. 1p. 111–117.

JULSING, M. K. et al. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of isoprene in *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1377–1384, 21 jun. 2007.

JUZELIUNAS, E. et al. Influence of wild strain *Bacillus mycoides* on metals: From corrosion acceleration to environmentally friendly protection. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 27, p. 6085–6090, 2006.

KARMAKAR, B. et al. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 195–202, jul. 2000.

LIANG, T.-W. et al. An Amphiprotic Novel Chitosanase from *Bacillus mycoides* and Its Application in the Production of Chitooligomers with Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1302, 10 ago. 2016.

LIN, H. et al. Biodegradation of TNT using *Bacillus mycoides* immobilized in PVA-sodium alginate-kaolin. **Applied Clay Science**, v. 83–84, p. 336–342, 2013.

LIN, H. Y.; YU, C. P.; CHEN, Z. L. Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoides*. **Ecological Engineering**, v. 52, p. 270–277, 2013.

LINDMARK-HENRIKSSON, M. **Biotransformations of turpentine constituents: oxygenation and esterification**. [s.l.] Mid Sweden University, 2003.

LIU, Y. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 1, p. 20–30, jan. 2017.

LUO, T. et al. Nematodes avoid and are killed by *Bacillus mycoides*-produced styrene. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 159, n. June, p. 129–136, 2018.

MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: Uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382–387, 2007.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 31 maio. 2017a.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 20 jun. 2017b.

MIRATA, M. A.; HEERD, D.; SCHRADER, J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. 764–771, 2009.

MOHAPATRA, S. et al. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 12, p. 206–213, dez. 2017.

MOLINA, G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Food Chemistry**, v. 174, p. 606–613, 2015.

NAJAFI, A. R. et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 163, n. 3, p. 188–194, 2010.

NAJAFI, A. R. et al. Comparison and modification of models in production of biosurfactant for *Paenibacillus alvei* and *Bacillus mycoides* and its effect on MEOR efficiency. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 128, p. 177–183, 2015.

NARAYANAN, A.; RAMANA, K. V. Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. **3 Biotech**, v. 2, n. 4, p. 287–296, 23 dez. 2012.

NEGRO, V. et al. Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: Review on limonene case study and energy valorization. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 806–815, ago. 2016.

PAULINO, B. N. **Otimização de processos biotecnológicos para a produção de compostos de aroma a partir de substratos monoterpênicos** Campinas Universidade Estadual de Campinas, , 2014.

PAZ, A. et al. Vanillin production by *Bacillus aryabhattai*. **New Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 423, maio 2016.

PAZ, A. et al. Fed-batch production of vanillin by *Bacillus aryabhattai* BA03. **New Biotechnology**, v. 40, p. 186–191, jan. 2018.

PERKINS, C. et al. Biotechnological applications of microbial bioconversions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1050–1065, 18 nov. 2016.

PESSÔA, M. G. et al. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, 2019.

PIMENTEL, M. R. et al. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011.

POLLI, A. D. et al. **Bactérias endofíticas isoladas de folhas de *Trichilia elegans* e seu potencial antagônico no controle do fitopatógeno *Sphaceloma* sp.** Anais Eletrônico do VII Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. **Anais...** Maringá: 2013

ROMANOWSKA, I.; STRZELECKI, B.; BIELECKI, S. Biosolubilization of Polish brown coal by *Gordonia alkanivorans* S7 and *Bacillus mycoides* NS1020. **Fuel Processing Technology**, v. 131, p. 430–436, 2015.

- ROTTAVA, I. et al. Screening of microorganisms for bioconversion of (–)β-pinene and R-(+)-limonene to α-terpineol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1128–1131, set. 2010a.
- ROTTAVA, I. et al. Microbial oxidation of (–)-α-pinene to verbenol production by newly isolated strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2221–2231, 6 dez. 2010b.
- SALES, A. et al. Biogenesis of aroma compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 77–84, 2018.
- SAVITHIRY, N. et al. Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. **Biodegradation**, v. 9, n. 5, p. 337–341, 1998.
- SCHEMPP, F. M. et al. Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017.
- SHIMONI, E.; RAVID, U.; SHOHAM, Y. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 1, p. 1–9, fev. 2000.
- SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, K.; GHOSH SACHAN, S. Biotransformation of eugenol to vanillin by a novel strain *Bacillus safensis* SMS1003. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 2422, p. 1–13, 2018.
- SMITHA, M.; SINGH, S.; SINGH, R. Microbial biotransformation: A process for chemical alterations. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. 4, n. 2, p. 47–51, 21 fev. 2017.
- STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257–268, 2004.
- TORRES, S. et al. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. **Food Research International**, 2009.
- TRYTEK, M.; JEDRZEJEWSKI, K.; FIEDUREK, J. Bioconversion of α-pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 181–188, 2015.
- VESPERMANN, K. A. C. et al. Biotransformation of α- and β-pinene into flavor compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805–1817, 20 mar. 2017.
- WAGNER, W. P.; HELMIG, D.; FALL, R. Isoprene biosynthesis in *Bacillus subtilis* via the methylerythritol phosphate pathway. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 1, p. 37–40, 2000.
- YAN, L. et al. Biotransformation of ferulic acid to vanillin in the packed bed-stirred fermentors. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–12, 2016.
- YI, Y. et al. Exploring plant-microbe interactions of the rhizobacteria *Bacillus subtilis* and

*Bacillus mycoides* by use of the CRISPR-Cas9 system. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 4245–4260, 26 dez. 2018.

YOO, S. K.; DAY, D. F. Bacterial metabolism of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 739–745, 2002.

ZHAO, L. Q. et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1673–1676, 2006.





## CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS DE *Polygala fimbriata* E AVALIAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE MONOTERPENOS

### RESUMO

As bactérias vêm evoluindo em uma infinidade de condições ambientais, permitindo que sobrevivam em condições adversas e desenvolvam rotas metabólicas para utilizar substratos diversos (como meios não convencionais, por exemplo) para a produção de compostos de interesse, tornando-as potenciais biocatalisadores em processos de bioconversão de monoterpenos. Neste enfoque, o presente capítulo objetivou o isolamento de linhagens endofíticas do subarbusto *Polygala fimbriata* originário da Mata Atlântica, seguido da seleção das linhagens com maior potencial para bioconversão dos monoterpenos limoneno e  $\alpha$ -pineno. Dentre os 15 microrganismos isolados, 10 bactérias mostraram-se resistentes ao limoneno e 9 ao  $\alpha$ -pineno, sendo que as linhagens LBA1213 e LBA12111 foram avaliadas quanto à formação de produtos a partir dos substratos monoterpênicos em processo de bioconversão. Posteriormente, as linhagens LBA1213 (identificada como *Bacillus mycoides*) e LBA12111 (identificada como *Bacillus* spp.) demonstraram o potencial de resistência a concentrações de até 10% (v/v) de  $\alpha$ -pineno e/ou limoneno. Apesar da resistência, os ensaios de bioconversão não resultaram na formação de compostos de interesse a partir do limoneno. Entretanto, a partir da utilização de  $\alpha$ -pineno como substrato, verificou-se a formação majoritária de verbenol (399,16 mg/L e 261,31 mg/L) e de 2 outros compostos minoritários, não identificados, a partir do  $\alpha$ -pineno para ambas as linhagens. Destaca-se o desenvolvimento de bioprocessos conduzidos com as linhagens *Bacillus* spp e *Bacillus mycoides* para a produção de verbenol, composto com potencial aplicação na indústria de alimentos. Além disso, trata-se do primeiro relato do isolamento de linhagens de *Polygala fimbriata* e da utilização de *Bacillus mycoides* em ensaios de bioconversão de monoterpenos e produção de verbenol.

Palavras-chave: Biotransformação. Monoterpenos. *Screening*. Verbenol. *Bacillus*.

### 2.1 Introdução

Os monoterpenos são substratos promissores para aplicação na biotecnologia, muito embora a utilização desses compostos em processos biológicos ainda seja limitada em decorrência de sua baixa estabilidade química e alta toxicidade (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997). Diversas estratégias podem ser empregadas a fim de minimizar esses

entraves, tais como operação em sistemas bifásicos, engenharia genética, isolamento de microrganismos resistentes a esses compostos, otimização de processos, dentre outros (VESPERMANN *et al.*, 2017).

Neste sentido, o isolamento de microrganismos de ambientes naturais é um método de baixo custo para se obter biocatalisadores com possível aplicação biotecnológica (ROTTAVA *et al.*, 2010a), sendo realizado corriqueiramente através de ensaios de bioprospecção, exploração e investigação da flora e fauna (DUARTE *et al.*, 2013). Tal estratégia vem sendo aplicada com sucesso para a produção de compostos diversos, como o álcool perílico (BIER *et al.*, 2011), lipídeos microbianos (AYADI *et al.*, 2016), biopigmentos (CELESTINO *et al.*, 2014), polissacarídeos (ABDELLAH *et al.*, 2014), entre diversos outros. Além desses, a literatura técnica apresenta alguns exemplos de isolamento de microrganismos visando a biotransformação de limoneno (ABOLGHASEMI; HESHMATIPOUR; MEYBODI, 2013; BIER *et al.*, 2011; LERIN *et al.*, 2010; VAN DER WERF; DE BONT, 1998) e  $\alpha$ -pineno (BIER *et al.*, 2011; DEEPTHI PRIYA; PETKAR; CHOWDARY, 2014; ROTTAVA *et al.*, 2010a; TRYTEK; JEDRZEJEWSKI; FIEDUREK, 2015), utilizando especialmente fontes vegetais nos isolamentos (ALEU *et al.*, 2001; BICAS; PASTORE, 2007; BIER *et al.*, 2011; BOWEN, 1975; DEEPTHI PRIYA; PETKAR; CHOWDARY, 2014; ROTTAVA *et al.*, 2010b).

Os microrganismos isolados de fontes vegetais podem ser provenientes do interior dos tecidos vegetais (endofíticos) ou da superfície dos órgãos e tecidos vegetais (epifíticos) (AZEVEDO, 1998). Os endofíticos colonizam o interior dos tecidos vegetais sem lhes causar doenças, podendo inclusive auxiliar o hospedeiro no controle de doenças e pragas, ocasionar alterações fisiológicas, produzir toxinas, antibióticos, fatores de crescimento e diversas outras substâncias de interesse biotecnológico (AZEVEDO, 1998; POLLI *et al.*, 2013). Considerando seu potencial de produzir biomoléculas e o vasto campo vegetal ainda inexplorado, os microrganismos endofíticos devem ainda ser explorados para a síntese de compostos de interesse industrial (ABRAHÃO; MOLINA; PASTORE, 2013). Sendo assim, a grande diversidade de espécies vegetais disponível no planeta (cerca de 374.000) faz das plantas um extenso campo de exploração para o isolamento de microrganismos (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016).

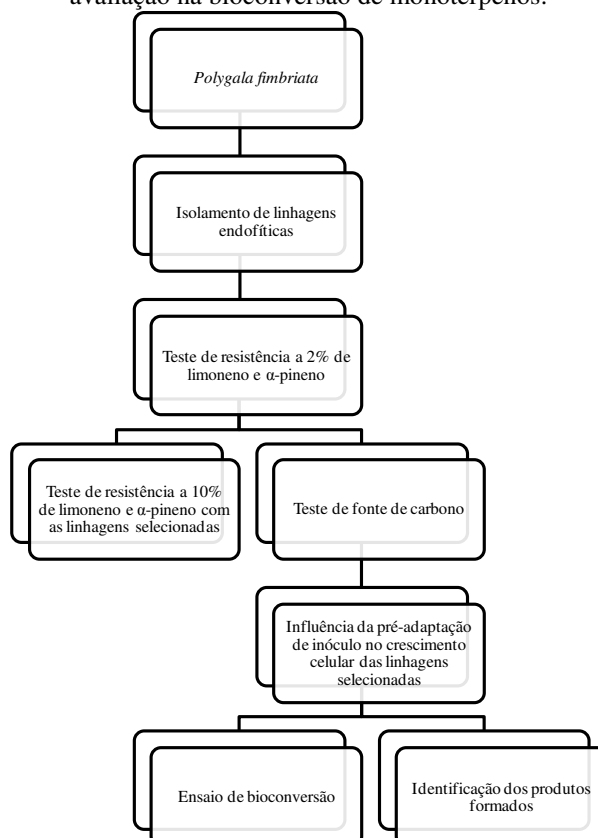
Com isso, pode-se pautar a escolha de uma fonte vegetal para isolamento em quatro fatores básicos: plantas oriundas de biomas únicos, plantas com história etnobotânica, plantas endêmicas com longevidade incomum e plantas de áreas de grande biodiversidade (STROBEL *et al.*, 2004), além da presença de potenciais substratos para biotransformação.

Com base nesses fatores, é importante considerar a biodiversidade brasileira como fonte potencial para isolamentos, uma vez que este abriga 20% do total de espécies do planeta, que estão distribuídas em biomas distintos: a floresta tropical úmida da Floresta Amazônica, a planície inundável do Pantanal, as savanas e bosques do Cerrado, as florestas semiáridas da Caatinga, os campos dos Pampas, e a floresta tropical pluvial da Mata Atlântica (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017a). Dentre estes, podemos dar destaque à Mata Atlântica, uma das regiões mais biodiversas do mundo, abrigando cerca de 20.000 espécies vegetais ou 35% de todas as espécies existentes no Brasil, que ocupava originalmente 1,3 milhões de km<sup>2</sup> do território brasileiro (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017b).

Sendo assim, o objetivo abordado neste capítulo foi isolar bactérias do subarbusto *Polygala fimbriata* oriundo do bioma Mata Atlântica (registrado no SisGen sob número A5A887E – “Isolamento de microrganismos de fontes naturais e avaliação de seu potencial para síntese ou bioconversão de compostos de aroma”), selecionar linhagens resistentes e com potencial para a bioconversão de limoneno e/ou  $\alpha$ -pineno em compostos de valor agregado.

## 2.2 Material e métodos

**Figura 5** - Mapa experimental do isolamento e seleção de linhagens bacterianas de *Polygala fimbriata* e avaliação na bioconversão de monoterpenos.



### 2.2.1 Reagentes e substratos

Os substratos utilizados nos ensaios de bioconversão foram (*R*)-(+)-limoneno (Sigma-Aldrich,  $\geq 93\%$  de pureza) e (*R*)-(+)- $\alpha$ -pineno (Sigma-Aldrich,  $\geq 97\%$  de pureza). O padrão utilizado para confirmação dos produtos foi o (*S*)-*cis*-verbenol (Sigma-Aldrich, 95% de pureza). Para extração dos compostos foi utilizado acetato de etila P.A. (Synth) adicionado de 1% (v/v) de *n*-decano (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$  de pureza) como padrão interno.

### 2.2.2 Isolamento de microrganismos de *Polygala frimbriata*

Diferentes partes do subarbusto *Polygala frimbriata* (raiz, caule, folhas e flores) coletado no município de Teófilo Otoni/MG foram esterilizadas externamente pela imersão em hipoclorito de sódio por 2 minutos, lavados com água estéril, imersos em etanol 70% por 2 minutos e novamente lavados em água destilada estéril (AZEVEDO, 1998).

Após este processo, os fragmentos foram dispostos em meio *Yeast Malt* (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; ágar 2%; água destilada) contido em placas de Petri. Decorridas 48 h de incubação a 30°C em estufa bacteriológica (Thelga, TE64CB), as colônias foram transferidas pelo método de esgotamento de inóculo para outra placa contendo YM. O processo foi repetido até a obtenção de colônias puras.

Os microrganismos foram agregados ao banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do ICT/UFVJM e codificados conforme o sistema de estoque do referido banco de microrganismos, onde os 2 primeiros dígitos indicam a fonte de isolamento (12 - *Polygala frimbriata*), o 3º dígito indica se o microrganismo é endofítico (1) ou epifítico (2) e os números finais indicam o número do isolado. Todos os isolados foram conservados a 4°C em tubos inclinados contendo Ágar YM e vaselina, e também congelados em meio YM e glicerol 20% a 20°C.

### 2.2.3 Caracterização morfológica e coloração de Gram

Os isolados foram cultivados em Ágar YM por ~12 h a 30°C, utilizando técnica de esgotamento em estria composta para obtenção de colônias puras, onde averiguou-se as características fenotípicas de colônias isoladas em triplicata: forma da colônia (circular ou irregular), elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada), consistência (seca, pouco mucosa ou mucosa), tamanho (mm), coloração, borda (ondulada, lobada,

denteada, filamentosa ou inteira), superfície (lisa, enrugada, papilada ou rugosa) e detalhe ótico (transparente, translúcida, opaca ou brilhante) (YANO *et al.*, 1993).

A diferenciação bacteriana de acordo com a composição da parede celular foi realizada por análise de coloração de Gram. O procedimento consistiu em cobrir o esfregaço com solução de cristal violeta por 1 minuto, depois cobrir com solução de iodo (Lugol) por 1 minuto, lavando-se em seguida com solução descorante (etanol P.A.) (30 segundos) e por fim lavado em água corrente e adicionar solução de fucsina por 30 segundos. Os esfregaços das culturas foram observados em microscópio ótico (Nikon, Eclipse E200) com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes), onde as células de coloração violeta se caracterizam em Gram-positivas e rosadas Gram-negativas.

#### **2.2.4 Cinética de crescimento padrão das linhagens LBA1213 e LBA12111 em meio YM**

As linhagens foram reativadas em Ágar YM com incubação por até 48 h a 30°C. Posteriormente, duas alçadas de cada cultura foram inoculadas em frascos cônicos de 250 mL contendo 100 mL de YM e incubadas em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, TE-421) por 48 h, a 30°C e 150 rpm.

A cinética de crescimento das linhagens foi avaliada por método direto e indireto, retirando-se as amostras às 0, 2, 4, 8, 24, 28, 32, 48, 52, 56, 72, 76, 80 e 96 h. O método direto consistiu na análise das amostras brutas por gravimetria, com a retirada de 3 mL do caldo fermentado (YM) em tubos tipo Falcon, o qual foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Nova Técnica, NT 825) a 10°C, por 12 min e rotação de 1591 g, descartando-se o sobrenadante e secando-se a biomassa em estufa bacteriológica (Thelga, TE64CB) a 105°C até peso constante. Os resultados foram expressos em gramas por litro (g/L).

No método indireto, a taxa de crescimento microbiano foi avaliada através da leitura de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro digital (Tecnal, UV5100) por um período de até 96 h de cultivo. Para tanto foi retirada alíquota de 1 mL do meio contendo a biomassa, a qual foi centrifugada em microtubo tipo Eppendorf em microcentrífuga de bancada (Nova Instrument, NI1802) por 10 min a 3000 rpm, descartando-se o sobrenadante e então resuspenso em água destilada. Os resultados foram apresentados em unidades de absorbância (UA). Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

As concentrações de biomassa  $C_x$  (g/L) foi obtida pela correlação entre a leitura da Densidade Ótica a um comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600}$ ) de amostras de caldo de

cultura e o peso seco referente, e estão expressas pelas equações 1 e 2 para as linhagens LBA1213 e LBA12111, respectivamente.

$$C_{x1213}=1,181x+1,578 \quad \text{Equação (1)}$$

$$C_{x12111}=1,7583x+0,7796 \quad \text{Equação (2)}$$

### ***2.2.5 Teste de resistência à presença de 2% ou 10% (v/v) de monoterpenos***

A seleção de bactérias resistentes a 2% de monoterpenos foi conduzida adotando-se a metodologia proposta por Bicas (2009). Para tanto, as linhagens foram reativadas em Ágar YM com incubação por 48 h a 30°C. Posteriormente, duas alçadas foram transferidas para frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de YM e 2% de (*R*)-(+)-limoneno (16,84 g/L) ou (*R*)-(+)-pineno (17,16 g/L), sendo então incubados em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, TE-421) por 48 h, a 30°C e 150 rpm.

Decorridas 48 h, 100 µL do caldo fermentado foi inoculado em Ágar YM contido em placas de Petri, seguido de espalhamento em superfície com auxílio de alça de Drigalski e incubação a 30°C por 48 h em estufa bacteriológica (Thelga, TE64CB). As culturas foram observadas e os microrganismos que apresentaram crescimento igual ou superior a 30 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) foram considerados resistentes à 2% dos referidos monoterpenos, e selecionados para o teste de fonte de carbono (adaptado de BICAS, 2009). Os ensaios foram conduzidos em duplicata.

Paralelamente, as linhagens LBA1213 e LBA12111 também foram avaliadas quanto à resistência a 10% (v/v) de limoneno e  $\alpha$ -pineno, adicionando-se separadamente os substratos a uma cultura de 24 h de idade de ambas as linhagens.

### ***2.2.6 Preparo de inóculo para os ensaios de bioconversão***

As linhagens foram reativadas em Ágar YM com incubação por até 48 h a 30°C. Posteriormente, duas alçadas de cada cultura reativada foram inoculadas em frascos cônicos de 250 mL contendo 100 mL de YM e incubadas em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, TE-421) por 48 h, a 30°C e 150 rpm. Em seguida, a biomassa foi centrifugada em tubos tipo Falcon em centrífuga refrigerada (Nova Técnica, NT 825) a 10°C, por 12 min e rotação de 1591 g, descartando-se o sobrenadante. A biomassa obtida foi reservada para os ensaios de bioconversão.

### ***2.2.7 Teste de fonte de carbono utilizando $\alpha$ -pineno e limoneno***

As linhagens que apresentaram capacidade de se desenvolver na presença dos monoterpenos testados e que alcançam uma  $DO_{600}$  (Densidade Ótica a um comprimento de onda de 600 nm)  $\geq 1$  UA (Unidade de Absorbância) após 48 h de cultivo em YM foram selecionadas para teste de fonte de carbono, uma vez que o baixo crescimento na etapa de produção do inóculo poderia ser um fator limitante nos ensaios posteriores, pois far-se-ia necessário a padronização da densidade ótica ( $DO_{600}$  entre 0,25 e 0,5 UA) nos testes de fonte de carbono.

A biomassa obtida conforme descrito no item 2.2.6, foi resuspensa em frascos cônicos de 250 mL contendo 100 mL de tampão fosfato (0,0665%  $KH_2PO_4$ , 0,2632%  $K_2HPO_4$  e água destilada) e padronizada a uma  $DO_{600}$  de 0,25-0,5 UA. A este meio foi adicionado  $\alpha$ -pineno (alíquotas de 0,5%, v/v, 4,29 g/L a cada 24 h) ou limoneno (0,5%, v/v, 4,21 g/L a cada 48 h). O experimento foi conduzido por 96 h a 30°C e 150 rpm de agitação, em incubadora refrigerada (Tecnal, TE-421).

### ***2.2.8 Efeito da indução enzimática na formação de produtos a partir de $\alpha$ -pineno pelas linhagens LBA1213 e LBA12111***

A fim de se verificar o efeito da pré-adaptação de inóculo (indução enzimática), 0,5% (v/v) de  $\alpha$ -pineno foram adicionados durante a etapa de crescimento em meio YM (item 2.2.6), quando as linhagens selecionadas atingiram metade da sua fase logarítmica, ou seja, às 6 h e 24 h de crescimento para as bactérias LBA12111 e LBA1213, respectivamente, visando adaptação do metabolismo bacteriano à presença dos monoterpenos, de modo a favorecer a formação de produtos (registrado no SisGen sob número A1152D5 – “Exploração do potencial biotecnológico de *Bacillus mycoides* para a produção de aditivos e ingredientes” e A286A4E – “Exploração do potencial biotecnológico de *Bacillus* sp para a produção de aditivos e ingredientes”).

### ***2.2.9 Ensaio de bioconversão de $\alpha$ -pineno ou limoneno pelas linhagens LBA1213 e LBA12111***

As linhagens selecionadas no teste de fonte de carbono foram resubmetidas ao ensaio descrito no item 2.2.7, avaliando também a influência da adaptação do inóculo (com ou

sem adaptação – item 2.2.8) no crescimento microbiano e geração de produtos. O crescimento microbiano foi avaliado por leitura de absorbância a 600 nm ( $DO_{600}$ ).

O consumo de substrato e formação de produtos foi avaliado por cromatografia gasosa, onde alíquotas de 500  $\mu$ L do caldo fermentado foram retiradas e extraídas com igual volume de acetato de etila. Um  $\mu$ L de amostra obtida anteriormente foi injetado em cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (GC-FID) 7820A (Agilent Technologies) acoplado com coluna HP-5 (30m de comprimento x 0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu$ m de espessura do filme). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (1,0 mL.min<sup>-1</sup>) e a temperatura do forno foi mantida a 80°C por 3 minutos, elevada até 200°C a uma taxa de 20°C/min e mantida por 4 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C (MOLINA, 2014). A confirmação da identidade dos compostos foi realizada por comparação com os padrões comerciais.

Paralelamente, foram preparadas curvas de calibração contendo pontos de diferentes concentrações de padrões com elevada pureza para os substratos (*R*)-(+)- $\alpha$ -pineno, e para o produto de interesse foi utilizado (*S*)-*cis*-verbenol, utilizando acetato de etila como solvente e *n*-decano como padrão interno para quantificação. A fim de se estabelecer o efeito de matriz, correspondente a biomassa das bactérias, foram realizadas ainda curvas de quantificação em matriz (tampão fosfato juntamente com biomassa estéril) com quantidades definidas de substratos para a determinação da eficiência de extração e correção dos resultados (PAULINO, 2014). Os resultados foram expressos em mg/L de verbenol, g/L de  $\alpha$ -pineno ou pA dos produtos não identificados.

As curvas de auto-oxidação do limoneno e  $\alpha$ -pineno foram construídas utilizando-se tampão fosfato com as mesmas concentrações de substratos (2% v/v de  $\alpha$ -pineno e 1% de limoneno) na ausência de biocatalisador (PAULINO, 2014).

#### **2.2.10 Análise estatística**

Com o intuito de avaliar e identificar se houve diferença significativa entre as concentrações de produtos formados durante os processos de biotransformação, foi realizado o teste de médias (Tukey), utilizando o software RStudio versão 1.0.153, ao nível de 5% de significância.

### **2.3 Resultados e discussão**



### 2.3.1 Isolamento de microrganismos de *Polygala fimbriata* e pré-seleção das linhagens bacterianas resistentes a 2% de $\alpha$ -pineno ou limoneno

Neste estudo foram isolados 15 microrganismos morfologicamente distintos a partir de fragmentos do subarbusto *Polygala fimbriata*, dos quais 7 foram bactérias Gram-positivas, 6 bactérias Gram-negativas e 2 fungos filamentosos (Tabela 4 do Material Suplementar). Dado o fato das bactérias terem evoluído em uma infinidade de condições ambientais, que lhes permitiu sobreviver em condições adversas e desenvolver rotas metabólicas para utilizar os substratos disponíveis (como meios não convencionais, por exemplo) e produzir diversos compostos diversos (DE CARVALHO, 2017), as etapas posteriores de seleção de microrganismos foram conduzidas apenas com as bactérias, com o intuito de avaliar seu potencial em bioconverter limoneno ou  $\alpha$ -pineno.

No teste de resistência à presença de 2% de limoneno ou  $\alpha$ -pineno, 10 bactérias mostraram-se resistentes ao limoneno e 9 ao  $\alpha$ -pineno (Tabela 2) representando 77 e 69% das linhagens testadas, respectivamente. Resultados similares foram observados nos estudos de Bicas (2009) e Bier e colaboradores (2011), onde 50% e 75% das linhagens testadas cresceram na presença de 2% de limoneno, respectivamente. Já em relação aos testes na presença de  $\alpha$ -pineno, Bier e colaboradores (2011) verificaram que 80% das cepas foram hábeis em crescer na presença do monoterpene.

**Tabela 2** – Seleção dos microrganismos endofíticos de *Polygala fimbriata* quanto à resistência a 2% (v/v) de limoneno e  $\alpha$ -pineno.

Microrganismo	Fonte de isolamento	Limoneno	$\alpha$ -Pineno
LBA1211	Flor	-	-
LBA1212	Raiz	+	+
LBA1213	Raiz	+	+
LBA1214	Raiz	+	-
LBA1215	Caule	+	+
LBA1216	Caule	-	-
LBA1217	Caule	+	+
LBA1218	Caule	+	+
LBA1219	Folha	+	+
LBA12110	Folha	+	+
LBA12111	Folha	+	+
LBA12112	Caule	+	+
LBA12113	Raiz	X	X
LBA12114	Caule	X	X
LBA12115	Caule	-	-

**Legenda:** LBA – Laboratório de Biotecnologia de Alimentos; (+) – positivo no teste de resistência; (-) – negativo no teste de resistência, X – ensaio não realizado.

Quanto à resistência a 10% (v/v) de limoneno e  $\alpha$ -pineno foi verificado que a linhagem LBA12111 é resistente a 10% para ambos os monoterpenos testados, ao passo que a LBA1213 só é resistente a elevadas concentrações de  $\alpha$ -pineno. Tal fato incorre que, uma vez hábeis em bioconverter esses substratos a compostos de interesse, essas linhagens podem ser utilizadas em sistemas que operem com altas concentrações de substrato, uma das grandes limitações de seleção de linhagens para processos de bioconversão. Esses dois novos isolados bacterianos foram posteriormente identificados por análise de similaridade de cds sequenciados de genes constitutivos (16S rRNA) como *Bacillus mycoides* (LBA1213) e *Bacillus* spp. (LBA12111) (dados não demonstrados).

Dentre as linhagens que apresentaram capacidade de se desenvolver na presença dos monoterpenos testados, foram selecionadas aquelas que alcançaram crescimento satisfatório ( $DO_{600} \geq 1$  UA) após 48 h de cultivo em YM, sendo estas as linhagens LBA1212, LBA1213, LBA1214, LBA12110 e LBA12111. Estes microrganismos apresentaram uma  $DO_{600}$  de  $1,150 \pm 0,02$ ;  $1,834 \pm 0,016$ ;  $1,560 \pm 0,012$ ;  $1,938 \pm 0,032$  e  $1,827 \pm 0,011$  UA após 48 h de crescimento em meio YM, livre de monoterpenos, respectivamente.

### **2.3.2 Teste de fonte de carbono e bioconversão de limoneno**

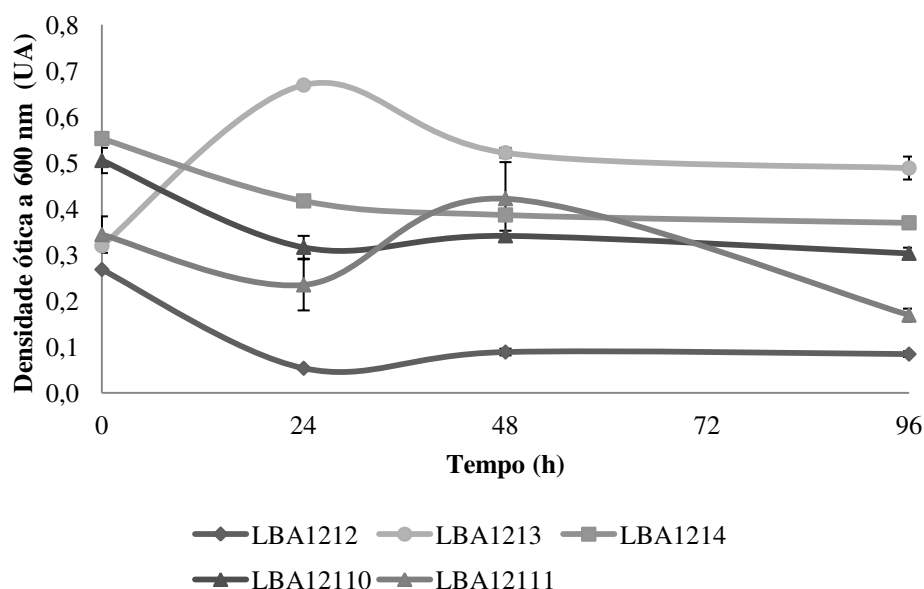
As linhagens LBA1212, LBA1214 e LBA12110 apresentaram redução no crescimento no período avaliado quando cultivadas em tampão fosfato adicionado de 0,5% (v/v) de limoneno como única fonte de carbono (Figura 6), isto pode estar associado ao fato de que compostos de aroma podem ter uma influência negativa sobre a fisiologia celular, aumentando a fluidez da membrana, levando a gradientes transmembranares colapsantes, e consequentemente reduzindo a viabilidade celular (BERGER, 2007). Por outro lado as linhagens LBA1213 e LBA12111 apresentaram picos de crescimento durante o período avaliado, às 24 h e 48 h, respectivamente, indicando serem as únicas linhagens que foram capazes de metabolizar o limoneno com única fonte de carbono e, portanto, passíveis de serem utilizadas em ensaios de bioconversão desse substrato. A resistência dos microrganismos ao limoneno é um ótimo indicativo do seu potencial como agente de biotransformação, apesar disso não é possível garantir que o microrganismo resistente seja também capaz de converter o limoneno em derivados de interesse (BICAS, 2009; BICAS; PASTORE, 2007).

Abolghasemi, Heshmatipour e Meybodi (2013) reportaram a resistência de bactérias Gram-Positivas em meio YM adicionado de limoneno, e ainda a sobrevivência das

mesmas em meio mineral (0,5%  $\text{MgSO}_4$ , 3%  $\text{NaNO}_3$ , 1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5%  $\text{KCl}$ , 0,01%  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , água destilada), com a presença exclusiva de limoneno como fonte de carbono (5%, v/v).

Neste âmbito, a bioconversão de limoneno também foi conduzida com as linhagens LBA1213 e LBA12111, que embora capazes se desenvolver na presença de limoneno como única fonte de carbono e utilizá-lo para o seu crescimento, não produziram compostos de interesse. Deste modo, optou-se por não dar prosseguimento aos ensaios de bioconversão de limoneno, considerando que o intuito da condução de um bioprocessamento é a obtenção de derivados do substrato utilizado.

**Figura 6** – Cinética de crescimento bacteriano na presença de limoneno como única fonte de carbono. Condições de processo: 30°C, 150 rpm, 96 h.



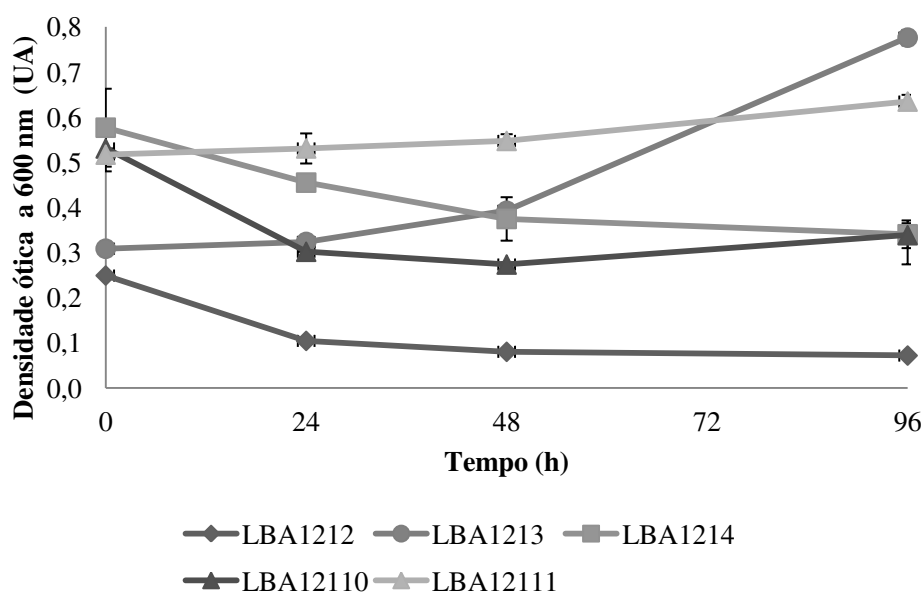
### 2.3.3 Teste de fonte de carbono e bioconversão de $\alpha$ -pineno

O uso de  $\alpha$ -pineno como fonte de carbono em processos de bioconversão já foi reportado para bactérias Gram-Negativas (*Pseudomonas* e *Serratia*) e Gram-Positivas (*Bacillus*), com destaque para o gênero *Pseudomonas*, que em alguns casos apresentou tolerância até 10% (v/v) desse substrato, com crescimento satisfatório dos microrganismos e com formação de produtos derivados, como isonovalal (VESPERMANN *et al.*, 2017; YOO; DAY, 2002).

No presente estudo, as bactérias LBA1212, LBA1214 e LBA12110 tiveram seu crescimento inibido na presença de 0,5% (v/v) de  $\alpha$ -pineno, verificado pela redução da densidade ótica do caldo fermentado dessas linhagens (Figura 7). No entanto, as bactérias

Gram-Positivas LBA1213 e LBA12111 demonstraram potencial em utilizar esse monoterpreno como fonte de carbono, aumentando sua densidade ótica em  $0,47 \pm 0,016$  UA e  $0,12 \pm 0,014$  UA após 96 horas de processo (o que corresponde a  $2,13 \pm 1,59$  g/L e  $0,99 \pm 0,80$  g/L de células), respectivamente. A utilização dos substratos de interesse como única fonte de carbono é um importante passo para a seleção de biocatalisadores resistentes a monoterprenos, pois pode indicar a existência de rotas metabólicas de degradação e uma possibilidade de formação de produtos intermediários (BICAS, 2009). Isso demonstra que as linhagens LBA1213 e LBA12111 podem ter a capacidade de metabolizar esse substrato e transformá-lo em derivados de interesse, sendo assim, os ensaios de bioconversão foram conduzidos com estas linhagens para avaliar a possível formação de produtos derivados e serão discutidos nas seções a seguir.

**Figura 7** - Crescimento bacteriano na presença de  $\alpha$ -pineno como única fonte de carbono.



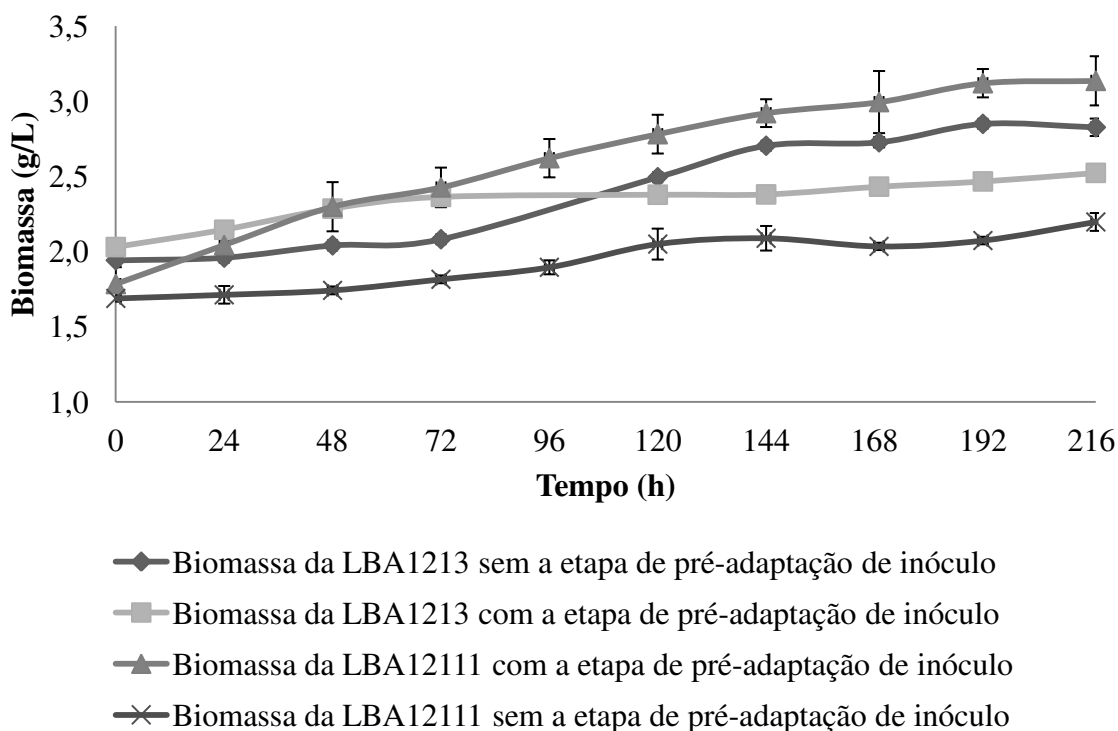
#### 2.3.3.1 Efeito da pré-adaptação de inóculo no crescimento microbiano e formação de produtos na bioconversão de $\alpha$ -pineno

A adição de substrato durante a fase de crescimento microbiano pode ser utilizada como ferramenta para adaptar o metabolismo microbiano ao monoterpreno a ser bioconvertido, favorecendo a formação de produtos durante a bioconversão (BIER; MEDEIROS; SOCCOL, 2017; FONTANILLE; LARROCHE, 2003; YOO; DAY, 2002). Entretanto, em alguns casos, essa estratégia não traz ganhos à concentração de produtos

formados (MOLINA *et al.*, 2015; SALES, 2018), mostrando que o benefício do uso dessa estratégia dependerá da resposta de cada microrganismo estudado.

O efeito negativo da pré-adaptação de inóculo foi verificado sobre o crescimento celular da linhagem LBA1213, demonstrado por um menor crescimento ( $0,4934 \pm 0,021$  g/L) no ensaio realizado com a etapa de pré-adaptação de inóculo em comparação com o ensaio sem pré-adaptação de inóculo ( $0,8846 \pm 0,030$  g/L), após 217 h de processo (Figura 8). Enquanto isso, para a linhagem LBA12111, foi possível observar um aumento no crescimento microbiano (Figura 8) quando submetida à pré-adaptação de inóculo ( $1,502 \pm 0,1357$  g/L), em comparação à ausência desse tratamento ( $0,5497 \pm 0,0247$  g/L). Desta forma, é possível inferir que a metabolização de  $\alpha$ -pineno foi melhorada ao se aplicar esta técnica, influenciando diretamente no crescimento celular.

**Figura 8** - Efeito da pré-adaptação celular sobre o crescimento da LBA1213 e LBA12111 na presença de  $\alpha$ -pineno (0,5%, v/v) como única fonte de carbono.

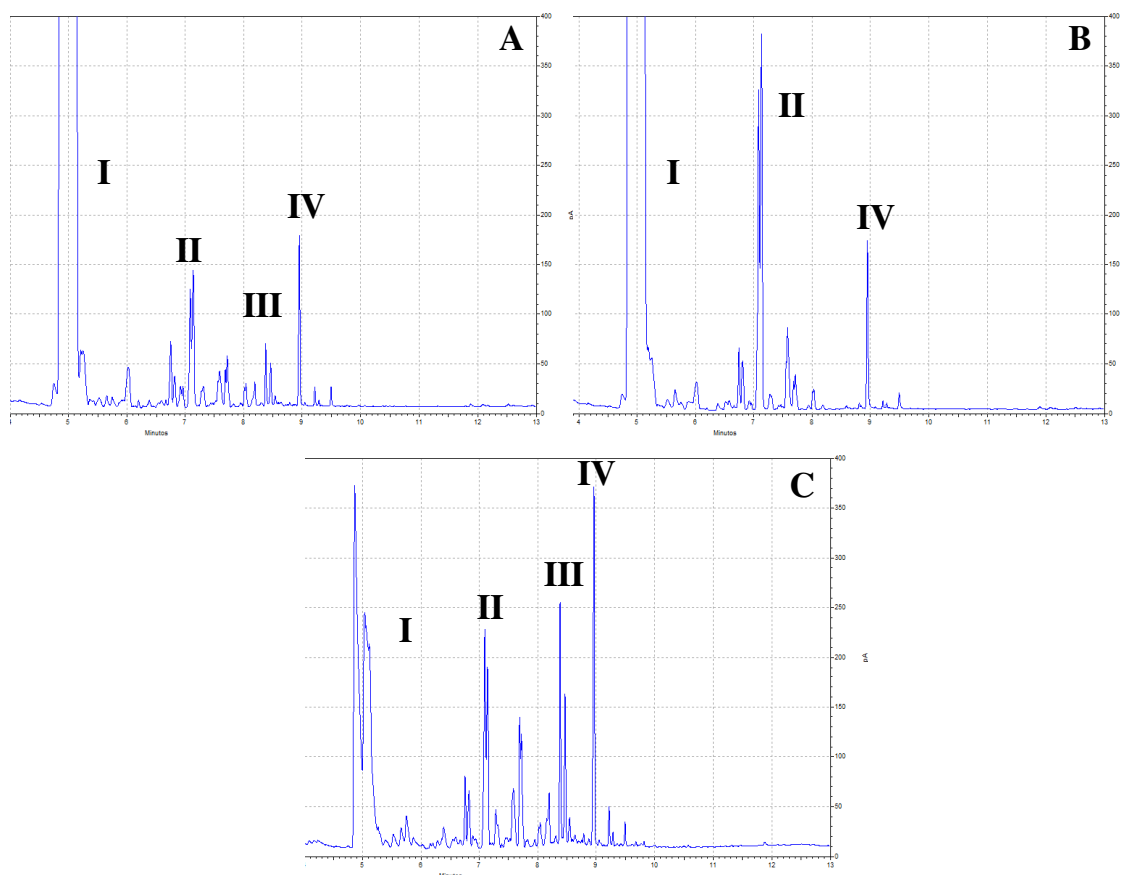


**Legenda:** LBA1213 (sem adaptação – losango, com adaptação - quadrado) e LBA12111 (sem adaptação – xis, com adaptação - triângulo). Condições do processo: 30°C, 150 rpm.

Partindo desse pressuposto, a formação de produtos a partir da bioconversão de  $\alpha$ -pineno foi avaliada para a linhagem LBA1213, sem a etapa de pré-adaptação de inóculo, e para a linhagem 12111, com pré-adaptação de inóculo. A Análise de Variância (ANOVA) das amostras, a um nível de significância de 5%, mostrou que a concentração de produtos

formados foi estatisticamente diferente entre todos os tratamentos avaliados. Além disso, a formação destes compostos seguiu um padrão crescente em função do tempo, sendo diferente e superior ao ensaio de auto-oxidação (Figura 9).

**Figura 9** - Cromatogramas dos produtos formados a partir de pineno após 96 h de processo para os ensaios de auto-oxidação (A), LBA1213 sem pré-adaptação de inóculo (B) e LBA12111 com pré-adaptação de inóculo (C) para uma altura de pico de 400 pA.



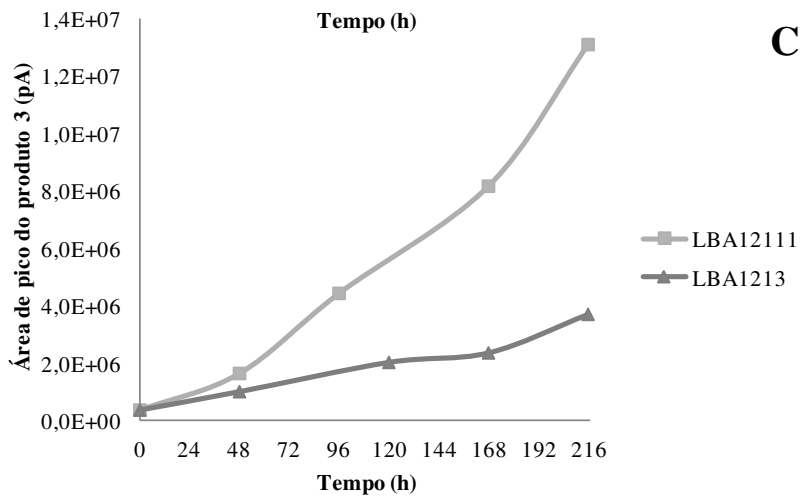
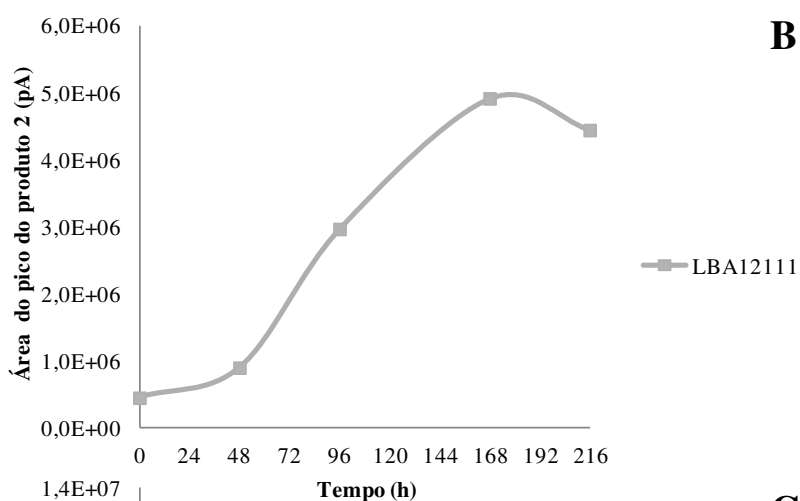
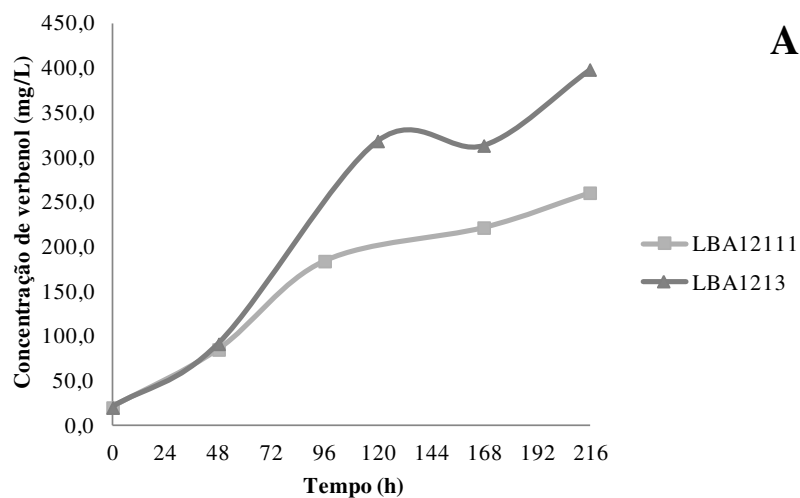
**Legenda:** I –  $\alpha$ -pineno, II- verbenol, III – produto 2 (tempo de retenção 8,38 min) e IV – produto 3 (tempo de retenção 8,95 min). Condições de processo: 30°C, 150 rpm e 96 h de processo.

O produto majoritário formado da degradação do  $\alpha$ -pineno pela linhagem LBA1213 foi identificado como verbenol (399,16 mg/L) através da comparação do tempo de retenção com padrão comercial. Outro produto minoritário não identificado (Produto 3, tempo de retenção 8,95 minutos) também foi detectado, com máxima produção de ambos às 216 horas de processo (Figura 9B, Figura 10A e Figura 10C).

De forma análoga, para a linhagem LBA12111, além da produção de verbenol (261,31 mg/L) e do produto 3, a formação de um produto 2 (tempo de retenção 8,38 minutos) foi observada, como pode ser visto nas Figura 9 (C) Figura 10 (A, B e C). A produção de verbenol pela linhagem LBA1213 foi aproximadamente 53% superior à LBA12111 após 217

h de processo, ao passo que a formação do produto 3 é notadamente superior pela linhagem LBA12111 (250% em comparação direta de área dos picos).

**Figura 10** - Produção de verbenol (A), produto 2 (B) e produto 3 (C) pelas linhagens LBA1213 (triângulo) e LBA12111 (quadrado) até 216 horas de processo à 30°C, 150 rpm e adição de  $\alpha$ -pineno a cada 24 h.

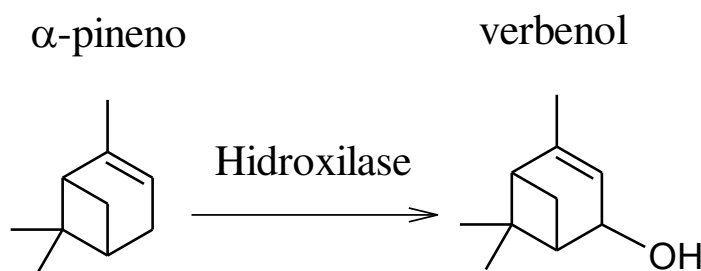


O verbenol (2-pineno-4-ol) é sintetizado comercialmente a partir de  $\alpha$ -pineno,

sendo reportado em óleos essenciais de hortelã, murta e de folhas e frutos de acácia, por exemplo (BURDOCK, 2010). Este composto apresenta um odor de cânfora e menta, sendo um composto alimentar altamente valorizado, podendo ser utilizado em bebidas, sopas, carnes, salsichas e sorvetes (AGRAWAL; DEEPIKA; JOSEPH, 1999; PESSÔA, 2017)

A conversão de  $\alpha$ -pineno a verbenol (Figura 11) é comumente observada em ensaios de biotransformação utilizando fungos filamentosos, como o *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Pleurotus sapidus*, *Chrysosporium pannorum*, além de relatos de sua produção por culturas de células de *Picea abies* (AGRAWAL; DEEPIKA; JOSEPH, 1999; AGRAWAL; JOSEPH, 2000; KRINGS *et al.*, 2009; PREMA; BHATTACHARYYA, 1962; TRYTEK; JEDRZEJEWSKI; FIEDUREK, 2015; VANEK *et al.*, 2005).

**Figura 11** - Conversão de  $\alpha$ -pineno a verbenol.



Brand e colaboradores (1975) apresentam a produção de *cis*- (0,1%) e *trans*-verbenol (1%) por *Bacillus cereus*, isolado do intestino de um besouro *Ips paraconfusus*, tendo, também, mirtenol como produto majoritário do processo (BRAND *et al.*, 1975). A bactéria *Serratia marcescens*, isolada de lodo de esgoto, também foi capaz de oxidar  $\alpha$ -pineno (0,4%) a *trans*-verbenol como produto majoritário após 24 h de processo a 30°C, além da formação de verbenona e *trans*-sobrerol como produtos minoritários. Os autores relatam que essa formação de produtos secundários é uma característica comum na oxidação microbiana de  $\alpha$ -pineno (WRIGHT *et al.*, 1986). A produção de *trans*-verbenol (400 mg/L) e verbenona (300 mg/L) foi verificada pela bactéria *Hormonema* sp. após 96 h, a 25°C e agitação de 150 rpm (VAN DYK; RENSBURG; MOLELEKI, 1998).



## 2.4 Conclusão

Ao total, foram isolados 15 microrganismos do subarbusto *Polygala fimbriata*, quais 10 bactérias mostraram-se resistentes ao limoneno e 9 bactérias resistentes ao  $\alpha$ -pineno. Dentre estas, 5 (LBA1212, LBA1213, LBA1214, LBA12110 e LBA12111) foram selecionados para o teste de fonte de carbono com limoneno e  $\alpha$ -pineno em decorrência do seu bom crescimento. Além disso, a linhagem 12111 se mostrou resistente a elevadas concentrações de  $\alpha$ -pineno e limoneno (até 10% v/v), e a 1213 apenas ao  $\alpha$ -pineno, denotando seu potencial de metabolização desses substratos. As linhagens LBA1213 (identificada como *Bacillus mycoides*) e LBA12111 (identificada como *Bacillus* sp.) foram utilizadas em processos de bioconversão de limoneno e  $\alpha$ -pineno. Quando limoneno foi utilizado como substrato, não foi observada a formação de produtos derivados de interesse, enquanto a partir de  $\alpha$ -pineno ocorreu a formação majoritária de verbenol (399, 16 mg/L e 261,31 mg/L, respectivamente) e de 2 produtos não identificados para ambas as linhagens.

Trata-se do primeiro relato da literatura para ensaios de resistência e bioconversão de monoterpenos por *Bacillus mycoides*, e do isolamento de microrganismos de *Polygala fimbriata*, além da síntese de verbenol em concentrações consideráveis, um importante composto de aroma aplicável a indústria de alimentos, por linhagens de *Bacillus*.

Estudos futuros de otimização de processos, utilização de sistemas bifásicos e utilização de células em crescimento podem ser passíveis para propiciar um aumento na concentração de verbenol. Igualmente, a linhagem *Bacillus* spp. pode ainda ser avaliada quanto a um melhoramento genético, em função da sua resistência a 10% (v/v) de limoneno e  $\alpha$ -pineno e do potencial intrínseco das linhagens de *Bacillus* em expressar proteínas relacionadas às rotas de formação de terpenóides.

## REFERÊNCIAS

- ABDELLAH, M. et al. Screening for exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian raw camel milk. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 22, p. 2208–2214, 2014.
- ABOLGHASEMI, Z.; HESHMATIPOUR, Z.; MEYBODI, M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms from citrus waste water of citrus processing plant of Kosarin Ramsar-Iran. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 11, p. 134–141, 2013.
- ABRAHÃO, M. R. E.; MOLINA, G.; PASTORE, G. M. Endophytes : Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 367–372, 2013.
- AGRAWAL, R.; DEEPIKA, N.-U.-A.; JOSEPH, R. Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of alpha-pinene to verbenol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 2, p. 249–252, 20 abr. 1999.
- AGRAWAL, R.; JOSEPH, R. Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 335–337, 13 mar. 2000.
- ALEU, J. et al. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid patchoulol, ginsenos, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 11, p. 329–334, 2001.
- AYADI, I. et al. Single cell oil production from a newly isolated *Candida viswanathii* Y-E4 and agro-industrial by-products valorization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 901–914, 2016.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: **Microrganismos endofíticos**. [s.l.] Embrapa-CNPMA, 1998. p. 488.
- BERGER, R. G. **Flavours and Fragrances - Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.
- BICAS, J. L. **Estudos de obtenção de bioaroma pela biotransformação de compostos terpênicos**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 563–567, 2007.
- BIER, M. C. J. et al. Isolation and screening of microorganisms with potential for biotransformation of terpenic substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1019–1026, 2011.
- BIER, M. C. J.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. **Fungal Biology**, v. 121, n. 2, p. 137–144, fev. 2017.

- BOWEN, E. R. Potential by-products from microbial transformation of D-limonene. **Florida State Horticultural Society**, p. 304–308, 1975.
- BRAND, J. M. et al. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. **Nature**, v. 254, n. 5496, p. 136–137, 16 mar. 1975.
- BURDOCK, G. A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 6nd. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010.
- CELESTINO, J. DOS R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. 2014.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201, 20 maio 2016.
- DE CARVALHO, C. C. C. R. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 250–263, 2017.
- DEEPTHI PRIYA, K.; PETKAR, M.; CHOWDARY, G. V. Isolation , screening and identification of terpene resistant microorganisms from decayed yellow orange citrus fruits. **Research and Reviews : Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 12–21, 2014.
- DUARTE, S. H. et al. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 377–381, 2013.
- FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Optimization of isonovalal production from  $\alpha$ -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 534–540, jan. 2003.
- KRINGS, U. et al. Autoxidation versus Biotransformation of  $\alpha$ -Pinene to Flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective Hydroperoxidation of  $\alpha$ -Pinene and Stereoselective Dehydrogenation of Verbenol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 9944–9950, 11 nov. 2009.
- LERIN, L. et al. Microorganisms screening for limonene oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 399–405, 2010.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 31 maio. 2017a.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 20 jun. 2017b.
- MOLINA, G. **Biotechnological production of aroma compounds by the biotransformation of terpenes**. [s.l.] UNICAMP, 2014.
- MOLINA, G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Food Chemistry**, v. 174, p. 606–613,

2015.

PAULINO, B. N. **Otimização de processos biotecnológicos para a produção de compostos de aroma a partir de substratos monoterpênicos** Campinas Universidade Estadual de Campinas, , 2014.

PESSÔA, M. G. **Prospecting endophytic biocatalysts for bioflavors production**. [s.l.] UNICAMP, 2017.

POLLI, A. D. et al. **Bactérias endofíticas isoladas de folhas de *Trichilia elegans* e seu potencial antagonístico no controle do fitopatógeno *Sphaceloma* sp.** Anais Eletrônico do VII Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. **Anais...** Maringá: 2013

PREMA, B. R.; BHATTACHARYYA, P. K. Microbiological Transformation of Terpenes: II. Transformation of alpha-Pinene. **Applied microbiology**, v. 10, p. 524–528, 1962.

ROTTAVA, I. et al. Screening of microorganisms for bioconversion of (-)β-pinene and R-(+)-limonene to α-terpineol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1128–1131, set. 2010a.

ROTTAVA, I. et al. Microbial oxidation of (-)-α-pinene to verbenol production by newly isolated strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2221–2231, 6 dez. 2010b.

SALES, A. **Limonene biotransformation by *Colletotrichum acutatum* and *C. nymphaeae***. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2018.

STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257–268, 2004.

TRYTEK, M.; JEDRZEJEWSKI, K.; FIEDUREK, J. Bioconversion of α-pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 181–188, 2015.

VAN DER WERF, M.; DE BONT, J.; LEAK, D. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 55, p. 147–177, 1997.

VAN DER WERF, M. J.; DE BONT, J. A. M. Screening for microorganisms converting limonene into carvone. **New Frontier in Screening of Microbial Biocatalysts**, v. 53, n. C, p. 231–234, 1998.

VAN DYK, M. S. VAN; RENSBURG, E. VAN; MOLELEKI, N. Hydroxylation of (+)limonene, (-)alpha-pinene and (-)beta-pinene by a *Hormonema* sp. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 4, p. 431–436, 1998.

VANEK, T. et al. Formation of trans-verbenol and verbenone from alpha-pinene catalysed by immobilised *Picea abies* cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 321–325, 2005.

VESPERMANN, K. A. C. et al. Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805–1817, 20 mar. 2017.

WRIGHT, S. J. et al. Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3–4, p. 224–227, 1986.

YANO, D. M. Y. et al. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, 1993.

YOO, S. K.; DAY, D. F. Bacterial metabolism of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 739–745, 2002.



### **CAPÍTULO 3- OBTENÇÃO DE TERPINEÓIS A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DE $\alpha$ - PINENO E LIMONENO POR LINHAGEM FÚNGICA ISOLADA DE *Eucalyptus* spp.**

#### **RESUMO**

O uso de linhagens fúngicas em processos de biotransformação pode ser considerado mais vantajoso em comparação às biotransformações bacterianas, considerando que os fungos tendem a formar os produtos desejados com alterações estruturais mínimas e em concentrações consideráveis. O isolamento de linhagens selvagens de ambientes naturais pode ser uma estratégia promissora para a obtenção de biocatalisadores, e a aplicação de técnicas de seleção de baixo custo pode tornar esse processo ainda mais acessível. Deste modo, este trabalho teve como objetivos isolar e selecionar microrganismos resistentes ao limoneno e  $\alpha$ -pineno, com capacidade de utilizar estes monoterpenos como fonte de carbono, bem como estudar os parâmetros do bioprocessamento visando maximizar a obtenção de produtos obtidos pela bioconversão. Além disso, este trabalho visou o desenvolvimento de uma técnica mais barata e rápida de seleção de linhagens resistentes a monoterpenos, utilizando isolados de *Eucalyptus* spp. A partir dos testes propostos, a linhagem fúngica LBA1323 demonstrou potencial em utilizar  $\alpha$ -pineno e limoneno como fonte de carbono e transformá-los majoritariamente a terpineno-4-ol ( $426,14 \pm 140,92$  mg/L) e  $\alpha$ -terpineol ( $360 \pm 56$  mg/L), respectivamente. Na sequência, foi identificado que a formação de terpineno-4-ol é não indutível, considerando que não houve alteração da produção sob efeito da indução enzimática. A análise ultramorfológica deste bioprocessamento indicou efeitos tóxicos do contato das células da linhagem LBA1323 com  $\alpha$ -pineno, e possivelmente do terpineno-4-ol. Finalmente, os estudos de permeabilização celular por congelamento-descongelamento e sonicação, e a utilização de etanol como co-solvente e sistema de micelas reversas com Tween 80 não acarretaram em ganhos na produção de terpineno-4-ol. Este trabalho permitiu o isolamento de uma nova linhagem fúngica de *Eucalyptus* spp. potencial para a produção de terpineno-4-ol a partir de  $\alpha$ -pineno, a qual também é capaz de bioconverter outro monoterpeno, o limoneno, a  $\alpha$ -terpineol. Ambos os terpineóis são compostos de aromas interessantes para a aplicação nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, de produtos de limpeza e alimentícia, além do potencial bioativo inerente a elas.

**Palavras-chave:** terpineno-4-ol.  $\alpha$ -terpineol. Co-solventes. Indução enzimática. Fungo.

### 3.1 Introdução

A utilização de monoterpenos, especialmente limoneno e  $\alpha$ -pineno, em processos de bioconversão é notória, principalmente pela abundância e baixo custo desses substratos (VESPERMANN *et al.*, 2017). Contudo, as reações de bioconversão de monoterpenos em sistemas biológicos podem ser limitadas em função de sua alta volatilidade, baixa solubilidade em água, instabilidade química e toxicidade (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997).

Nos processos de biotransformação, o crescimento celular e a fase de produção ocorrem separadamente, onde têm a conversão dos substratos às moléculas de interesse pelas células em repouso (LIN; TAO, 2017), tendo a considerável vantagem de uma facilidade de recuperação dos produtos finais, uma vez que essas transformações ocorrem predominantemente em soluções tampão (SMITHA; SINGH; SINGH, 2017).

Tradicionalmente, linhagens fúngicas selvagens são os biocatalisadores mais estudados nestes processos, e o seu isolamento a partir de espécies vegetais pode ser considerado como um primeiro passo para a compreensão do surgimento de metabólitos secundários em plantas, e também um indicativo da ativação de enzimas específicas em fungos (BORGES *et al.*, 2009). As biotransformações utilizando linhagens fúngicas podem ser consideradas mais vantajosas em comparação às bacterianas, uma vez que o metabolismo das bactérias é mais rápido e pode resultar na degradação dos compostos formados, ao passo que as fúngicas tendem a formar os produtos desejados com alterações estruturais mínimas e em concentrações consideráveis (FAROOQ; ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 2004).

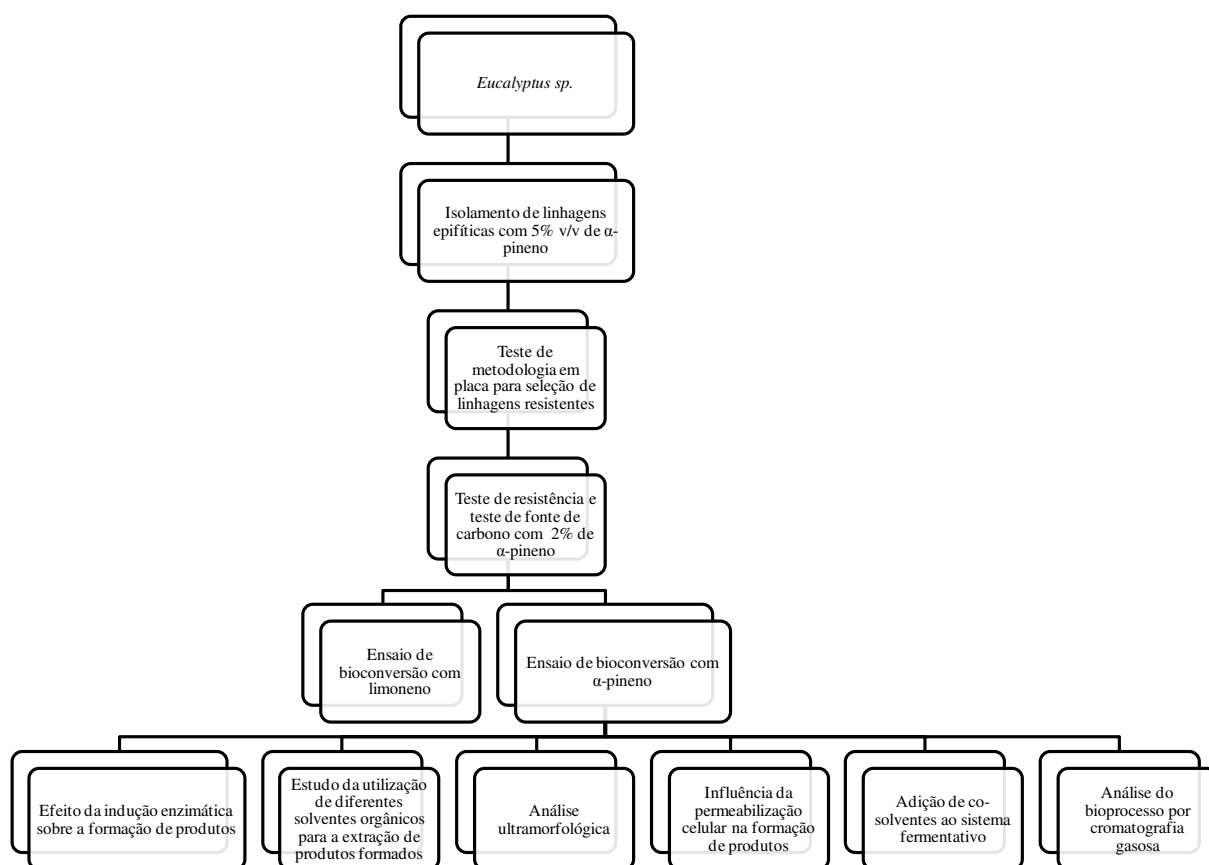
A biotransformação de monoterpenos por fungos já é bem estabelecida na literatura técnica, e apresenta resultados promissores. O fungo *Aspergillus niger* foi utilizado na bioconversão de  $\beta$ -pineno a  $\alpha$ -terpineol, alcançando aproximadamente 15,5 g/L de produto sob condições otimizadas a 35°C (ROTTAVA *et al.*, 2010a), enquanto a biotransformação de  $\alpha$ -pineno pelo fungo *Chrysosporium pannorum* resultou na formação de 1,33 g/L de produtos (verbenol e verbenona) sob baixas temperaturas (10-20°C). Têm-se também a produção de 2,44 g/L (*R*)-(+)- $\alpha$ -terpineol a partir de (*R*)-(+)-limoneno sob condições otimizadas (24-28°C, 200-310 rpm, 0,5% (v/v) de substrato e 0,25 m/m de inóculo) pelo fungo *Fusarium oxysporum* 152b (BICAS *et al.*, 2008b), e a produção de 7,8 g/L de limoneno-1,2-diol a partir de 20 g/L de (*S*)-(+)-limoneno pelo fungo *Colletotrichum nymphaeae* em biorreator de bancada operando a 27°C, 300 rpm e 1 vvm de oxigênio (SALES, 2018).



O presente capítulo teve por objetivo isolar e selecionar microrganismos resistentes de *Eucalyptus* spp, capazes de utilizar limoneno e/ou  $\alpha$ -pineno como fonte de carbono, bem como estudar os parâmetros relacionados à formação de produtos por bioconversão, tais como o efeito da indução enzimática, permeabilização celular, utilização de co-solventes e sistema de micelas reversas.

### 3.2 Material e métodos

**Figura 12** - Mapa experimental para obtenção de terpeneóis a partir da bioconversão de  $\alpha$ - pineno e limoneno por linhagem fúngica isolada de *Eucalyptus* spp.



#### 3.2.1 Reagentes e substratos

Os substratos utilizados nos ensaios de bioconversão foram (*R*)-(+)-limoneno (Sigma-Aldrich,  $\geq 93\%$  de pureza) e (*R*)-(+)- $\alpha$ -pineno (Sigma-Aldrich,  $\geq 97\%$  de pureza). O padrão utilizado para confirmação do produto foi o *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol (Fluka, 99% de pureza). Para a extração dos compostos foi utilizado acetato de etila P.A. (Synth) adicionado de 1% (v/v) de *n*-decano (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$  de pureza) como padrão interno.

### 3.2.2 Isolamento de microrganismos de *Eucalyptus* spp

Folhas e frutos de *Eucalyptus* spp foram coletados na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri/Campus JK, bem como amostra do solo circunvizinho à árvore, e utilizados no isolamento. O procedimento consistiu no depósito das referidas amostras em placas de Petri contendo 15 mL de Yeast Malt Ágar (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; ágar 2%; água destilada) e 5% v/v de  $\alpha$ -pineno devidamente homogeneizado no meio. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Thelga, TE64CB) a 30°C por até 72 h.

As colônias isoladas foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar YM livre de terpeno com auxílio de alça bacteriológica estéril, e incubado novamente a 30°C por até 72 h.

As linhagens isoladas foram agregadas ao banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do ICT/UFVJM e codificada conforme o sistema de estoque do referido banco de microrganismos, onde os 2 primeiros dígitos indicam a fonte de isolamento (13 – *Eucalyptus* spp.), o 3º dígito indica que o microrganismo é epifítico (2) e os números finais indicam o número do isolado.

### 3.2.3 Teste de resistência e de fonte carbono utilizando $\alpha$ -pineno

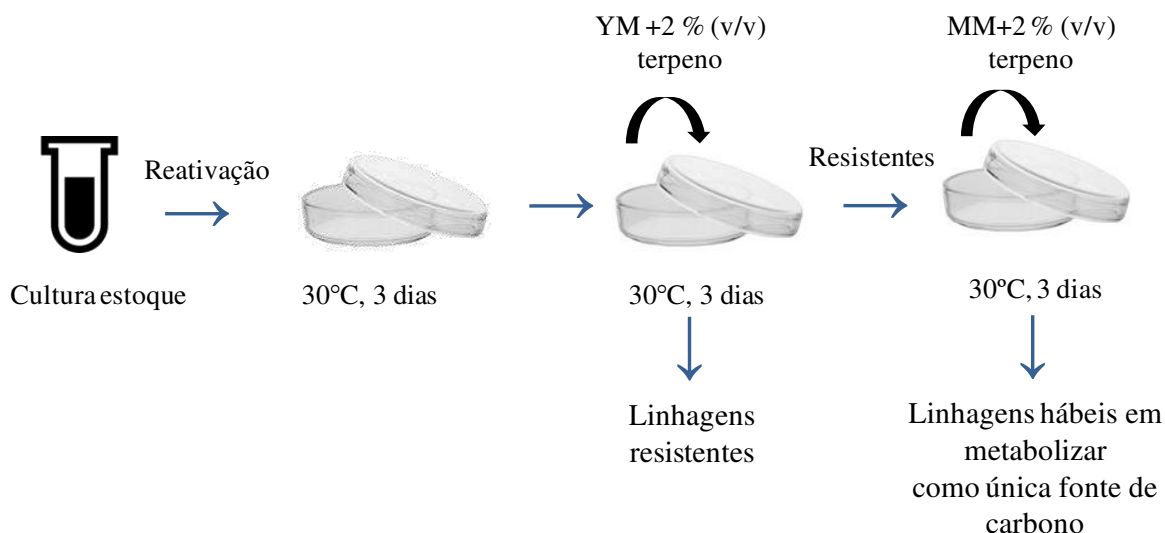
Os microrganismos isolados foram posteriormente avaliados quanto à sua capacidade de resistência utilizando-se 15 mL de Ágar YM adicionado de 2% (v/v) de  $\alpha$ -pineno disposto em placas de Petri de 100 mm de diâmetro. O meio foi vertido, preferencialmente, imediatamente antes do uso. Após o enrijecimento do meio, procedeu-se com o inóculo das linhagens pré-cultivadas em Ágar YM (24 h para bactérias ou 72 h de idade para fungos filamentosos). A linhagem fúngica foi inoculada de forma central com auxílio de alças de inoculação estéreis. Já o inóculo inicial de bactérias foi realizado por meio da adição de 100  $\mu$ L de suspensão de biomassa pré-cultivada em meio YM líquido (DO<sub>600</sub> de 0,5 UA) sobre a superfície da placa de YM adicionado do monoterpeno, com posterior homogeneização com auxílio de alça de Drigalski estéril. As placas foram incubadas a 30°C por até 72 h.

A validação da eficácia do método proposto deu-se através de testes com uma linhagem de *Bacillus* spp. (LBA12111), pertencente ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (ICT/UFVJM), cuja resistência e utilização de terpenos como fonte única de

carbono foi conhecida através de métodos padronizados na literatura (Capítulo 2). Os testes descritos foram conduzidos por um período de 48-72 h, a 30°C, em estufa bacteriológica (Thelga, modelo TE64CB).

As linhagens que apresentaram crescimento na etapa anterior foram avaliadas quanto à capacidade de metabolização do  $\alpha$ -pineno (2%, v/v) como única fonte de carbono, adotando-se a mesma metodologia, contudo substituiu-se o Ágar YM por Ágar Meio Mineral (MM; cloreto de potássio 0,05%; fosfato de potássio bibásico 0,1%; nitrato de sódio 0,3%; sulfato de ferro heptahidratado 0,002%; sulfato de magnésio heptahidratado 0,103%; ágar 2%; água). Em ambos os casos, considerou-se como resultado positivo as linhagens que apresentaram crescimento após decorridas 72 h de incubação (Figura 13).

**Figura 13** - Representação esquemática do teste de resistência e fonte de carbono frente a compostos terpênicos.



### 3.2.4 Preparo de inóculo fúngico para ensaios fermentativos

O fungo LBA1323 foi cultivado em Ágar YM por 72 h à 30°C, decorrido esse período cinco pedaços deste ágar (aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) foram transferidos para frascos cônicos de 250 mL contendo 150 mL de meio YM. A biomassa foi homogeneizada em ambiente estéril com auxílio de ultraturrax (Tecnal, TE-102), e então incubada a 30°C e agitação de 150 rpm por 72 h. A biomassa foi recuperada por filtração a vácuo utilizando funil de Buchner e papel filtro, sendo posteriormente reservada para utilização nos ensaios de bioconversão.

### 3.2.5 Ensaio de bioconversão de monoterpenos

A biomassa recuperada no item 3.2.4 foi pesada em balança semi-analítica (Shimadzu, BL3200H), transferindo-se 20 g/L (peso úmido) para frascos cônicos de 250 mL contendo 100 mL de MM e 2% (v/v) de  $\alpha$ -pineno ou 1% (v/v) de limoneno, sendo então incubados a 30°C e 150 rpm por 96 h. Coletando-se alíquotas a cada 24 h para monitoramento do crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato, com resultados expressos em g/L de biomassa seca, mg/L de produto e g/L de substrato, respectivamente.

### 3.2.6 Efeito da indução enzimática na formação de terpineno-4-ol a partir de $\alpha$ -pineno

De modo a avaliar o efeito da indução enzimática na formação de produtos e no crescimento celular do fungo LBA1323, este microrganismo foi cultivado como descrito no item 5, adicionando-se 2 g/L (~0,25%, v/v) de  $\alpha$ -pineno ao caldo fermentado após 24 h de processo (SALES, 2018) e incubado por mais 48 h. A biomassa foi recuperada como descrito no item 3.2.4 e utilizada para os ensaios de bioconversão (3.2.5).

### 3.2.7 Influência da permeabilização celular na produção de terpineno-4-ol a partir de $\alpha$ -pineno

O efeito da permeabilização celular foi avaliado utilizando diferentes protocolos. A biomassa obtida no item 3.2.4 foi tratada com: i) ciclos de congelamento e descongelamento (4 h de congelamento e 30 minutos a 30°C repetidas 3 vezes) (MOLINA *et al.*, 2015); ii) liofilização (Terroni, LS3000) e iii) ciclos de sonicação (3 ciclos de 3 min com intervalos de 1 min entre cada ciclo com amplitude de 50%, em banho de gelo – Sonicador QSonica, Q55, frequência de 20kHz) (adaptado de FONTANILLE; LARROCHE, 2003).

### 3.2.8 Adição de co-solventes ao sistema fermentativo

O ensaio de bioconversão com co-solventes foi conduzido utilizando biomassa produzida e recuperada conforme o item 3.2.4, sob as mesmas condições do item 3.2.5. Contudo adicionou-se 1, 3 ou 5 % (v/v) de etanol (pureza > 99,8%) a 100 mL de MM (MOLINA, 2014). Separadamente, adicionou-se 0,1; 0,5 ou 0,9% (v/v) de Tween 80 (adaptado de TAN; DAY, 1998). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata a 30°C,

150 rpm de agitação por 96 h, coletando amostras a cada 24 h para monitoramento dos produtos formados e do crescimento celular.

### *3.2.9 Análise do bioprocesso por cromatografia gasosa*

O consumo de substrato e formação de produtos foram avaliados por cromatografia gasosa, retirando-se alíquotas do caldo fermentado a cada 24 h, as quais foram extraídas com igual volume de acetato de etila com posterior agitação em vórtex por 1 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 3000 rpm, em microcentrífuga de bancada (Nova Instruments, NI1802) para separação de fases. O sobrenadante foi coletado e desidratado com sulfato de sódio anidro para posterior injeção em cromatógrafo a gás.

Um  $\mu\text{L}$  de amostra anteriormente preparada foi injetado em cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (GC-FID) 7820A (Agilent Technologies) acoplado com coluna HP-5 (30m de comprimento x 0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste ( $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e a temperatura do forno foi mantida a  $80^\circ\text{C}$  por 3 min, elevada até  $200^\circ\text{C}$  a uma taxa de  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  e mantida por 4 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a  $250^\circ\text{C}$  (MOLINA, 2014). O substrato e os produtos formados foram quantificados por uma curva de calibração construída com diferentes concentrações do respectivo padrão comercial, utilizando *n*-decano como padrão interno.

Na identificação dos compostos foi empregado um cromatógrafo a gás cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (SHIMADZU, GCMS-QP2010 Ultra) equipado com uma coluna sílica fundida Restek Rtx-5MS (30 m comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme), 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano. Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão constante de  $1,8 \text{ mL}/\text{min}$ . O injetor permaneceu a  $220^\circ\text{C}$ , o detector foi mantido a uma temperatura de  $240^\circ\text{C}$  na linha de transferência, energia de impacto de +70 eV e faixa de massas de 35-400 m/z. A temperatura do forno do cromatógrafo a gás foi mantida a  $40^\circ\text{C}$  por 2 min, elevada a  $200^\circ\text{C}$  a uma taxa de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , permanecendo nessa temperatura por mais 5 min.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros com a biblioteca NIST2011, com similaridade superior a 90%, pelo seu índice de retenção e comparação com produto comercial.

Paralelamente, a quantificação foi realizada por curva de calibração contendo pontos de diferentes concentrações de padrões com elevada pureza para os substratos (*R*)-(+)- $\alpha$ -pineno ou *R*-(+)-limoneno, e para os produtos de interesse foi utilizado *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol, utilizando acetato de etila como solvente e *n*-decano como padrão interno. Para que fosse estabelecido o efeito de matriz, correspondente a biomassa do fungo LBA1323, foram realizadas ainda curvas de quantificação em matriz (meio mineral juntamente com biomassa estéril) com quantidades definidas de substratos para a determinação da eficiência de extração e correção dos resultados (PAULINO, 2014).

Dado o elevado custo do padrão comercial de terpineno-4-ol, a quantificação deste composto foi realizada utilizando o padrão comercial de  $\alpha$ -terpineol, expressando os dados em mg/L de  $\alpha$ -terpineol.

Ensaio auto-oxidação do limoneno e  $\alpha$ -pineno na ausência de células foram conduzidos utilizando-se meio mineral com as mesmas concentrações de substrato (2% v/v de  $\alpha$ -pineno e 1% v/v de limoneno) (PAULINO, 2014).

#### *3.2.10 Avaliação da extração de substrato e compostos formados durante a bioconversão com diferentes solventes*

De modo a propiciar maior extração dos produtos formados durante a bioconversão, bem como do substrato remanescente, três solventes com polaridades distintas foram testados na extração líquido-líquido: acetato de etila, e éter dietílico e hexano, para a seleção do solvente mais adequado.

#### *3.2.11 Análise morfológica das hifas do fungo LBA1323 na presença de $\alpha$ -pineno por microscopia ótica de varredura (MEV)*

O efeito do  $\alpha$ -pineno sobre a morfologia do micélio do fungo LBA1323 foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), avaliando a biomassa cultivada em meio YM sem e com  $\alpha$ -pineno (~ 0,24%, v/v) após 72 h de crescimento, e coletada ao final dos ensaios de bioconversão com  $\alpha$ -pineno (2%, v/v) após 96 h de processo.

A biomassa produzida conforme os itens 3.2.4, 3.2.5 e 3.2.6 e recuperada conforme o item 2.4 foram liofilizadas conforme descrito no item 3.2.7. As amostras foram então depositadas sobre suporte de carbono e examinadas quanto à sua morfologia por

microscopia ótica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico de mesa (Hitachi, TM3030) com um aumento de 1000 e 6000 vezes.

### 3.2.12 *Análise estatística dos dados*

Com o intuito de avaliar e identificar se houve diferença significativa entre tratamentos durante os processos de biotransformação, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), teste de T de Student e/ou o teste de médias (Tukey), utilizando o software Statistica versão 7.0 e Microsoft Excel, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 *Isolamento microrganismos de Eucalyptus spp e seleção de linhagens para bioconversão de $\alpha$ -pineno*

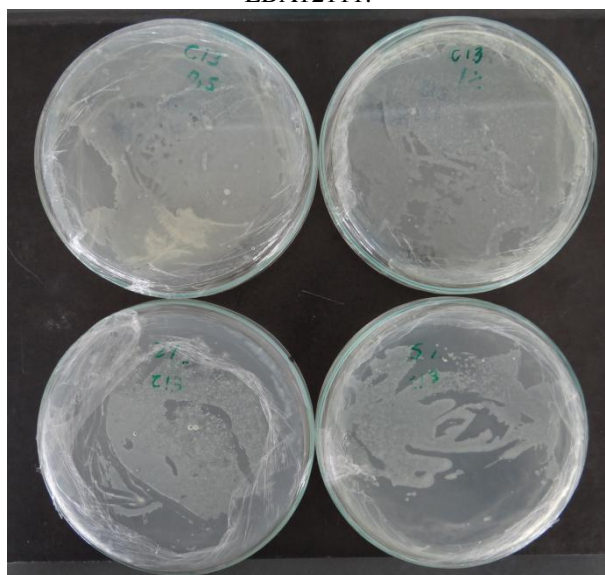
Usualmente, testes de resistência e fonte de carbono de baixo custo com novos isolados, frente a compostos terpênicos, acontecem através do inóculo da linhagem em estudo em meio de cultivo líquido com adição de terpeno a uma Concentração Mínima Inibitória (MIC), usualmente 2% (v/v). Em seguida, uma alíquota do caldo fermentado é transferida para uma placa de Petri para crescimento das colônias, se a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) forem superiores a 30, a linhagem é considerada resistente ao terpeno em estudo. Já no teste de metabolização como única fonte de carbono, uma alíquota do caldo fermentado da etapa anterior é transferida para um meio contendo apenas o monoterpene em estudo como fonte de carbono, seguido de novo plaqueamento para verificar o crescimento (ABOLGHASEMI; HESHMATIPOUR; MEYBODI, 2013; BICAS; PASTORE, 2007; DEEPTHI PRIYA; PETKAR; CHOWDARY, 2014; ROTTAVA et al., 2010). Este tipo de método convencional pode demandar duas fermentações submersas e 3 inóculos sólidos, variando de 2 a 7 dias para cada uma destas etapas, tornando o método dispendioso e demorado.

Face ao grande dispêndio de materiais e dias para a realização de testes convencionais de resistência e seleção, e baseando-se na técnica apresentada por De Carvalho e da Fonseca (2003), que trata-se da utilização de meio de cultivo sólido disposto em placas de Petri com a adição de diferentes concentrações de limoneno para avaliação do efeito da indução enzimática em *Rhodococcus opacus* PW4, foi observado que o método proposto

neste trabalho, ou seja, utilizando 3 plaqueamentos sucessivos, foi efetivo para a aplicação de teste de resistência com a linhagem de *Bacillus* spp. LBA12111 utilizando diferentes concentrações de  $\alpha$ -pineno (0,5; 1; 2 e 5%, Figura 14).

Logo, o teste proposto apresenta-se como uma alternativa mais rápida, menos dispendiosa, mais seletiva e severa para o mapeamento do comportamento inicial de microrganismos frente a compostos terpênicos se comparada ao teste convencional. Além disso, também é vantajosa em comparação a métodos que incluem a utilização placas saturadas com monoterpenos sob a forma de vapor (ORIEL; SAVITHIRY; CHANG, 1997; SAVITHIRY et al., 1998), uma vez que no método proposto neste trabalho há o contato direto do microrganismo com o composto, avaliando a real eficiência de sobrevivência das linhagens testadas.

**Figura 14** - Teste de resistência em YM Ágar adicionado de 0,5; 1; 2 e 5% de pineno (v/v) com *Bacillus* spp. LBA12111.



Verificada a efetividade do teste em placa, dos microrganismos isolados de *Eucalyptus* spp. e do solo circunvizinho à árvore, as linhagens bacterianas LBA1322 e LBA1324 apresentaram resultado positivo no teste de resistência com 2% (v/v) de  $\alpha$ -pineno, contudo não conseguiram crescer em meio contendo apenas esse substrato como fonte de carbono. Como o objetivo principal dos ensaios foi o de selecionar as linhagens capazes de bioconverter este substrato, as linhagens bacterianas não apresentaram potencial para estudos futuros dado seu resultado negativo no teste de fonte de carbono (Tabela 3 e Figura 15).

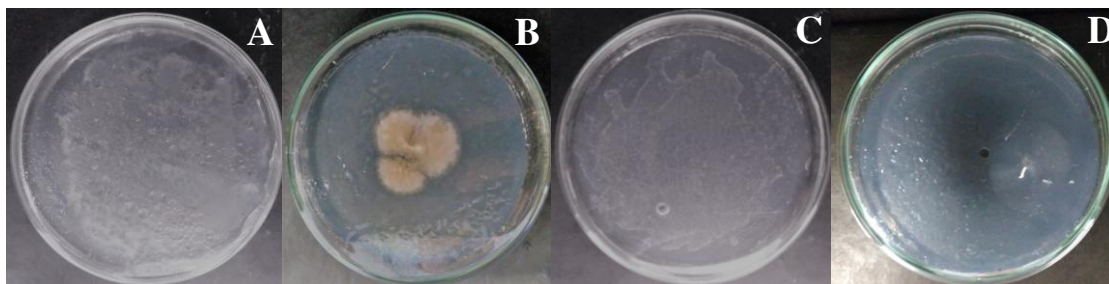


Entretanto, a linhagem fúngica LBA1323 apresentou crescimento tanto no teste de resistência na presença de  $\alpha$ -pineno, quanto no teste de fonte de carbono a 2% (v/v), demonstrando potencial para ensaios de bioconversão em fermentação submersa. Este microrganismo foi caracterizado visualmente por uma cor creme, aspecto seco, topografia plana, borda irregular, superfície felpuda, textura algodonosa e com ausência de pigmentação.

**Tabela 3** - Teste de resistência e fonte de carbono a 2% (v/v) de  $\alpha$ -pineno com as linhagens isoladas de *Eucalyptus* spp.

Microrganismo	Fonte de isolamento	Tipo aparente	Teste de resistência	Teste de fonte de carbono
LBA1321	Folha de <i>Eucalyptus</i> spp	Bactéria	Negativo	Negativo
LBA1322	Solo	Bactéria	Positivo	Negativo
LBA1323	Frutos de <i>Eucalyptus</i> spp	Fungo filamentoso	Positivo	Positivo
LBA1324	Folha de <i>Eucalyptus</i> spp	Bactéria	Positivo	Negativo

**Figura 15** - Teste de resistência a 2% (v/v) de  $\alpha$ -pineno para as linhagens LBA1322 (A), LBA1323 (B) e LBA1324 (D) e de fonte de carbono a 2% (v/v) de  $\alpha$ -pineno com o fungo filamentoso LBA 1323 (D) após 48 h a 30°C.



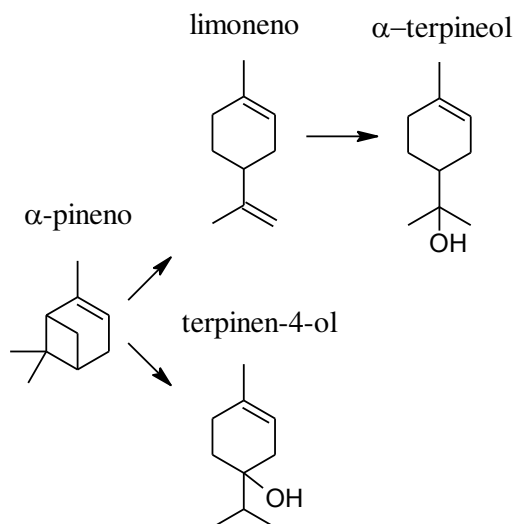
Deste modo, a linhagem fúngica LBA1323 foi selecionada para continuidade de ensaios de bioconversão de  $\alpha$ -pineno em fermentação submersa, avaliando a influência de vários fatores sobre a formação de produtos de interesse, tais como efeito da indução enzimática, permeabilização celular e adição de co-solventes.

### 3.3.2 Bioconversão de $\alpha$ -pineno pela linhagem fúngica LBA1323

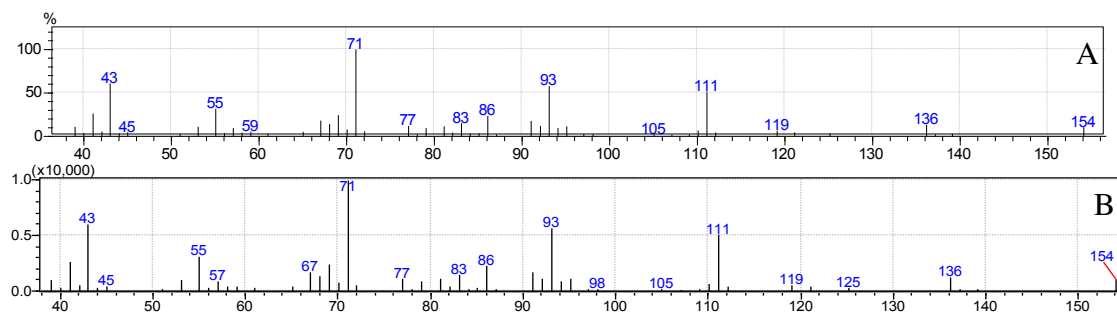
O fungo LBA1323 demonstrou potencial em converter  $\alpha$ -pineno (2%, v/v) em derivados oxigenados, além disso, outros produtos minoritários foram identificados no meio, como limoneno e  $\alpha$ -terpineol (Figura 16). O produto majoritário formado na bioconversão de  $\alpha$ -pineno foi identificado como terpineno-4-ol, através da comparação de espectro de massas pela biblioteca do NIST2011, com similaridade superior a 90% (Figura 17).

Neste estudo, a linhagem fúngica LBA1323 acumulou  $426 \pm 140$  mg/L de terpineno-4-ol após 48 h de processo (Figura 18), atingindo produtividade volumétrica de  $8,88 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e rendimento de  $0,086 \text{ g/g}$  (terpineno-4-ol/ $\alpha$ -pineno), ou  $8,57 \%$  de bioconversão.

**Figura 16** - Bioconversão de  $\alpha$ -pineno pela linhagem fúngica LBA1323.

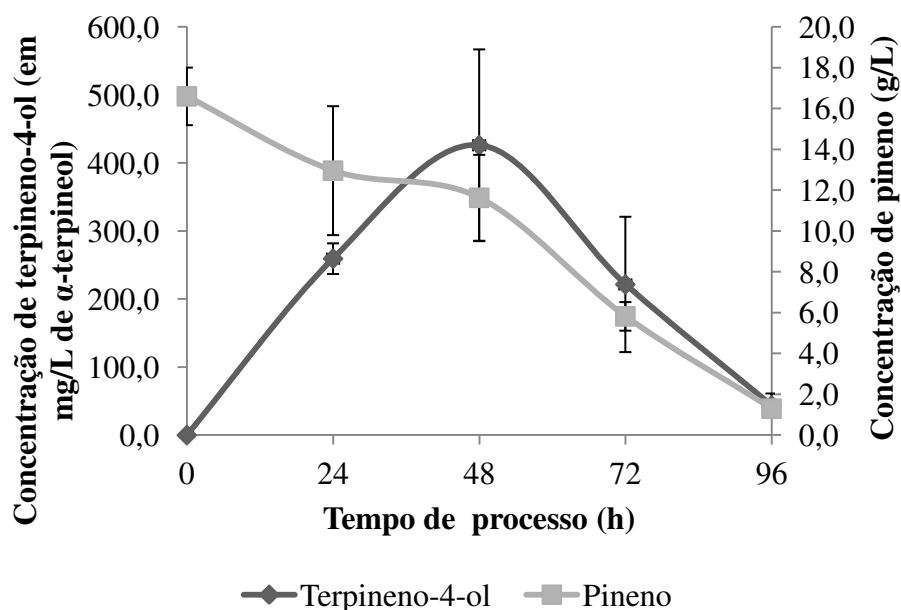


**Figura 17** - Espectro de massa do terpineno-4-ol da bioconversão de  $\alpha$ -pineno pelo fungo LBA1323 (A) e da base de dados do NIST2011 (B).



O terpineno-4-ol (4-methyl-1-propan-2-ylcyclohex-3-en-1-ol, 4-carvomenthenol; p-menth-1-en-4-ol; 4-terpineol and 1-terpineno-4-ol) está presente em diversos óleos essenciais, tais como de *Cupressus macrocarpa*, *Ledum palustre*, *Eucalyptus australiana* var. A., *Thuja occidentalis*, *Xanthoxylum rhetsa*, além de ser o composto majoritário de *Melaleuca alternifolia*, apresentando um aroma doce, verde cítrico e um caráter frutado tropical (BURDOCK, 2010; SHAO *et al.*, 2013). Este composto apresenta diversas atividades biológicas, tais como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anticancerígena e atuando contra a formação de biofilmes (YADAV; RAO, 2016).

**Figura 18** - Bioprodução de terpineno-4-ol (losangos) a partir de  $\alpha$ -pineno (quadrados) pela a linhagem fúngica LBA1323 a 30°C, 150 rpm por 96 h.



Conforme observado a partir da revisão técnica sobre este composto, terpineno-4-ol raramente é relatado na bioconversão de limoneno, mesmo como produto minoritário, contudo já se verificou sua formação por *Aspergillus niger* em meio de malte com 0,5% (v/v) de limoneno (42% da área de produtos formados), e por *Phomopsis* spp. como produto minoritário (BIER *et al.*, 2017; GARCÍA-CARNELLI *et al.*, 2014).

A formação deste composto como produto majoritário a partir de  $\alpha$ -pineno foi relatada exclusivamente com *Fusarium solani*, com a porcentagem de terpineno-4-ol em relação à área total dos produtos formados de 33% e 50,3% para os  $\alpha$ -(-) e  $\alpha$ -(+)-pineno, respectivamente. Esta mesma linhagem também produziu terpineno-4-ol a partir de sabineno (20,4%) como produto majoritário (CECATI *et al.*, 2018). E a sua formação como produto minoritário foi reportada apenas para *Pseudomonas* sp. PIN a partir de  $\alpha$ -pineno (YOO; DAY; CADWALLADER, 2001). Tais dados da literatura técnica ressaltam o grau de inovação e importância do presente trabalho, enfatizado pela formação de concentrações significativas de terpineno-4-ol a partir de  $\alpha$ -pineno pelo fungo LBA1323.

O entendimento do processo de bioconversão desses substratos aos produtos supracitados pode contribuir para melhor seleção das condições empregadas na condução do processo de bioconversão, visando favorecer uma maior produtividade. A avaliação de condições de processo, como temperatura e agitação, concentração de inóculo e substrato adequados propiciaram um aumento de 450 mg/L (MARÓSTICA; PASTORE, 2006) para ~2,4 g/L de  $\alpha$ -terpineol pelo fungo *Fusarium oxysporum* 152B, através da utilização de ferramentas de delineamento experimental (Plackett-Burmann seguido de um Delineamento

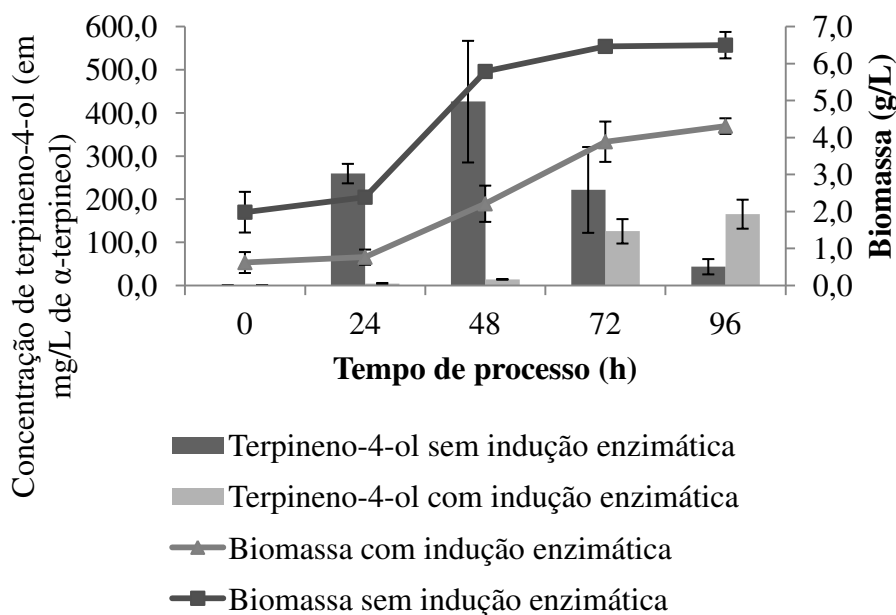
Composto Central Rotacional) (BICAS *et al.*, 2008b), além do uso de co-solventes e estudos de permeabilização celular (MOLINA *et al.*, 2015; TAN; DAY, 1998). Estes processos demonstram a importância de utilização de diversas técnicas para ampliar o conhecimento sobre o processo de bioconversão de  $\alpha$ -pineno e limoneno a derivados oxigenados.

### 3.3.3 Efeito da indução enzimática na formação de terpineno-4-ol a partir de $\alpha$ -pineno

O  $\alpha$ -pineno apresenta um potencial destrutivo sobre as membranas celulares de eucariotos e procariotos, além disso o coeficiente de partição entre octanol e água ( $\log P$ ) do  $\alpha$ -pineno é de 4,49, indicando que esse substrato é tóxico, uma vez que valores de  $\log P$  entre 1 e 5 são tóxicos às células vivas (SAVITHIRY *et al.*, 1998; VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997). Desta forma, a adição de baixas concentrações do monoterpene durante a fase de crescimento objetiva minimizar os efeitos tóxicos às células microbianas, uma vez que os biocatalisadores podem utilizar mecanismos de adaptação ao substrato, como o aumento de fluidez da membrana (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997). Além disso, a adição de substrato durante a fase de crescimento microbiano pode ser utilizada como ferramenta para prevenir o uso precoce do substrato, favorecendo a formação de produtos durante o processo de bioconversão (BIER *et al.*, 2017).

O efeito da indução enzimática foi avaliado sobre a formação de terpineno-4-ol (Figura 19, Tabela 5 do Material Suplementar). A adição de substrato na fase de crescimento (indução enzimática) acarretou em uma redução de aproximadamente 61,27% da formação do produto, em comparação com as células sem indução enzimática. Além disso, houve um atraso no pico máximo de produção das 48 h (sem indução -  $426 \pm 140$  mg/L) para 96 h (com indução -  $165 \pm 33$  mg/L). Considerando que ambos os resultados têm implicações negativas para a produtividade do sistema, a condução de processos futuros seria mais vantajosa utilizando-se células sem indução enzimática, por se tratar de um processo mais rápido (48 h) e mais produtivo.

**Figura 19** - Bioprodução de terpineno-4-ol (barras) e crescimento microbiano (linhas) para a linhagem fúngica LBA1323 a partir de  $\alpha$ -pineno. Ensaio conduzido sem indução enzimática (barras e linhas escuras) e ensaio com indução enzimática (barras e linhas claras).



Teste de médias ( $p < 0,05$ ) para produção de terpineno-4-ol: Sem indução enzimática - 48 h (a) > 72 (a,b,c) > 24 (a,b) > 96 (b,c) > 0 h (c); com indução enzimática - 72 e 96 h (a) > 0, 24 e 48 h (b). Condições de processo: 30°C, 150 rpm e 96 h de processo.

Foi possível inferir ainda que a formação de terpineno-4-ol não demonstrou-se indutível por esta linhagem fúngica. Resultado similar foi observado para a produção de  $\alpha$ -terpineol a partir de  $\beta$ -pineno por *Aspergillus niger* (TONIAZZO *et al.*, 2005) e  $\alpha$ -terpineol a partir de (*R*)-(+)-limoneno por *Fusarium oxysporium* (MARÓSTICA; PASTORE, 2007). Contudo, Fontanille, Le Flèche & Larroche (2002) demonstraram que a produção de isonovalal a partir de  $\alpha$ -pineno óxido foi favorecida pela adição de  $\alpha$ -pineno durante a fase de crescimento da *Pseudomonas rhodesiae* PF1.

Ressalta-se que o pico máximo de produção ocorreu ao final da fase de crescimento logarítmico (48 h e 96 h para os ensaios sem e com indução, respectivamente). Tal fato pode estar associado a um efeito tóxico do terpineno-4-ol sobre o fungo LBA1323, inibindo seu crescimento e impedindo, portanto, maior acúmulo de produto.

Isto pode ser demonstrado pelo fato de que, no experimento sem indução enzimática houve menor aumento percentual da biomassa (228%) contra 595% de aumento obtido no experimento com menor acúmulo de terpineno-4-ol ( $165 \pm 33$  mg/L), indicando que houve um direcionamento maior do consumo de substrato para o crescimento celular em detrimento da formação de produtos no ensaio sem indução enzimática.

Além disso, as alterações na morfologia das hifas do fungo LBA1323 (discutidas na seção a seguir) também corroboram um potencial efeito inibitório do terpineno-4-ol para o fungo em teste.

Com base nos dados obtidos para produção de terpineno-4-ol a partir de  $\alpha$ -pineno e os relatos da literatura para a produção de  $\alpha$ -terpineol, estudos futuros de otimização da produção de ambos os compostos deverão ser conduzidos sem a etapa de indução enzimática.

#### *3.3.4 Análise da morfologia das hifas do fungo LBA1323 na presença de $\alpha$ -pineno*

O efeito do  $\alpha$ -pineno sobre a morfologia do micélio do fungo LBA1323 foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), avaliando a biomassa cultivada em meio YM sem e com  $\alpha$ -pineno ( $\sim 0,24\%$ , v/v) após 72 h de crescimento, e coletada ao final dos ensaios de bioconversão com  $\alpha$ -pineno ( $2\%$ , v/v) após 96 h de processo, de modo a avaliar morfologicamente se houveram efeitos tóxicos do substrato sob a linhagem fúngica (Figura 20).

No experimento padrão de crescimento do fungo LBA1323 (YM sem adição de  $\alpha$ -pineno) foram observadas hifas de diâmetro homogêneo ( $2,18\ \mu\text{m}$ , Figura 20 A e B) e com superfície lisa, além da presença de grande quantidade de estruturas circulares. Quando comparado ao experimento padrão, foi possível observar alterações na morfologia do fungo LBA1323 na presença de  $\alpha$ -pineno nos demais tratamentos ( $0,24\%$  e  $2\%$  v/v, indução enzimática e bioconversão). Dentre elas, pode-se destacar a redução do número de estruturas circulares e um estreitamento das hifas (entre  $1,58$  e  $1,63\ \mu\text{m}$ , Figura 20 C a H). Além disso, foi possível notar um adensamento e perda da linearidade das hifas na biomassa fúngica, coletada após o ensaio de bioconversão com indução enzimática (Figura 20 G e H), além da formação de estruturas semelhantes a barris (setas indicadas na Figura 20 H).

O principal alvo para a toxicidade dos monoterpenos é a membrana celular, estes compostos dissolvem-se nas membranas celulares, perturbando assim a sua integridade e efetuando uma permeabilização específica. Um bom indicador desse efeito é a hidrofobicidade do solvente orgânico, expressa como o coeficiente de partição do solvente entre o octanol e a água ( $\log P$ ), onde compostos com um valor  $\log P$  entre 1 e 5 são, em geral, tóxicas para células inteiras (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997), como é caso dos compostos majoritários presentes no caldo fermentado do fungo LBA1323,  $\alpha$ -pineno e do terpineno-4-ol com  $\log P$  de 4,40 e 3,26, respectivamente (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997; YADAV; RAO, 2016).

Alterações na fluidez e permeabilidade membranar podem estar associadas à inserção dos terpenos entre as cadeias de ácidos graxos que constituem a membrana da bicamada lipídica, podendo levar à degradação da parede celular e outros efeitos, como a ruptura da membrana plasmática, perda do conteúdo celular, coagulação do citoplasma e lise celular (BRILHANTE et al., 2016). Mecanismos envolvidos no efeito antimicrobiano de  $\alpha$ -pineno residem principalmente na sua capacidade de induzir efeitos tóxicos na estrutura e funções da membrana plasmática, podendo expandir a membrana, aumentar sua fluidez, inibir enzimas incorporadas na membrana, além de destruir a integridade celular, inibir a respiração e os processos de transporte de íons, apresentando efeito antifúngico sobre diversas espécies como: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans* e *Penicillium notatum* (MERCIER; PROST; PROST, 2009). Enquanto o terpineno-4-ol pode ter efeitos sobre a respiração oxidativa e aumentar a permeabilidade membranar (SCHRADER, 2007), o qual exibe atividade microbiana *in vitro* contra *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Trichosporon spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, por exemplo (BRILHANTE et al., 2016).

Trabalhos correlatos da literatura com *Botrytis cinerea* cultivado na presença de vapor de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, o qual tem como compostos majoritários o terpineno-4-ol e 1,8-cineole, também apresentou alterações na sua estrutura morfológica, ocorrendo ramificação anormal de hifa na região apical e perda de linearidade com o surgimento de formações semelhantes a barris, além da presença de hifas enrugadas ou vazias e colapsadas (SHAO et al., 2013), além se verificar a coagulação citoplasmática, a hifa marcadamente enrugada, aumento da permeabilidade da membrana plasmática associado a alterações na composição dos ácidos graxos e a espessamento da parede da hifa.

O estudo da atividade antifúngica *in vitro* contra 12 espécies fitopatogênicas, englobando fungos das espécies *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* e *Alternaria alternata* demonstraram que o terpineno-4-ol apresenta uma EC<sub>50</sub> (inibição de 50% do crescimento em relação ao ensaio padrão) de 0,047% (v/v) e EC<sub>90</sub> de 0,112 % (v/v) (MORCIA; MALNATI; TERZI, 2011). Enquanto, em estudos com cepas dimórficas de *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum*, a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) variou entre 350-5720 µg/mL e 20-2860 µg/mL, respectivamente (BRILHANTE et al., 2016).

Apesar do potencial efeito antifúngico do terpineno-4-ol, preconizado pela literatura, contra diversas espécies, e possivelmente o mesmo efeito sobre o fungo LBA1323, faz-se ainda necessário estudos aprofundados de CMI e CMF do caldo fermentado.

Neste caso, as alterações morfológicas nas hifas do fungo LBA1323 podem ser decorrentes tanto do efeito do  $\alpha$ -pineno, substrato do processo, quanto do terpineno-4-ol, produto majoritário formado durante a biotransformação.

### 3.3.5 Avaliação da extração de $\alpha$ -pineno e terpineno-4-ol com diferentes solventes

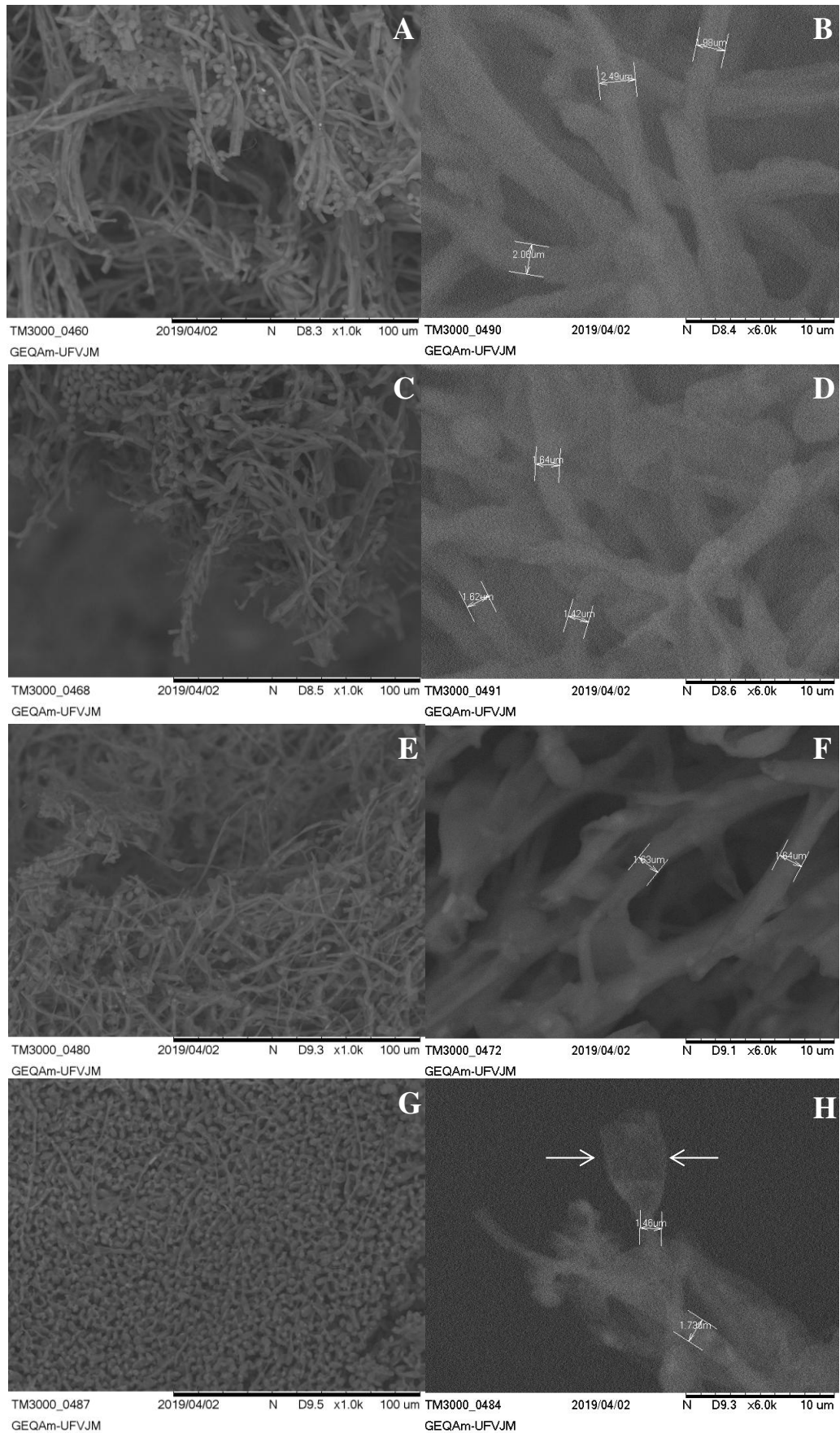
Uma limitação relacionada aos processos de bioconversão está na etapa de extração dos produtos formados, dada a complexidade do caldo fermentado, bem como a baixa concentração dos compostos de interesse, fazendo com que a escolha do solvente ideal seja necessária para maximizar a extração destes compostos (LIMBERGER; ALEIXO; FETT-NETO, 2007).

Os produtos mais comuns derivados do processo de bioconversão de  $\alpha$ -pineno, reconhecidos como verbenol, mirtenol e  $\alpha$ -terpineol, entre outros (VESPERMANN *et al.*, 2017), possuem grupos funcionais polares expressivos em sua estrutura (-OH), indicando afinidade por solventes de caráter polar. Dentre os três solventes avaliados na etapa de extração, acetato de etila, éter dietílico e o hexano, este último caracteriza-se por ser um solvente apolar, enquanto os demais são polares, sendo o acetato de etila o mais polar entre os três testados (NIST, 2018).

A influência do solvente de extração na quantificação dos produtos formados durante a bioconversão e, conseqüentemente, na avaliação de viabilidade do bioprocessamento pode ser confirmada com os resultados obtidos por Farooq *et al.* (2002). Neste estudo, produtos distintos foram extraídos ao se utilizar proporções diferentes da mistura de acetato de etila e hexano (3:7 ou 2:3, v/v), o qual foi verificado através de análise cromatográfica. Para a primeira mistura, foi obtido o metabólito  $\theta$ -6 $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -pineno, enquanto na segunda mistura extraíram-se os metabólitos  $\theta$ -4 $\beta$ ,5 $\beta$ -dihidroxi- $\beta$ -pineno e  $\theta$ -2 $\beta$ ,3 $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -pinen-6-ona. Deste modo, fica evidente o fato de que a mudança na composição do sistema de extração pode alterar o comportamento químico dos compostos, fazendo com que diferentes produtos sejam extraídos para a fase orgânica.



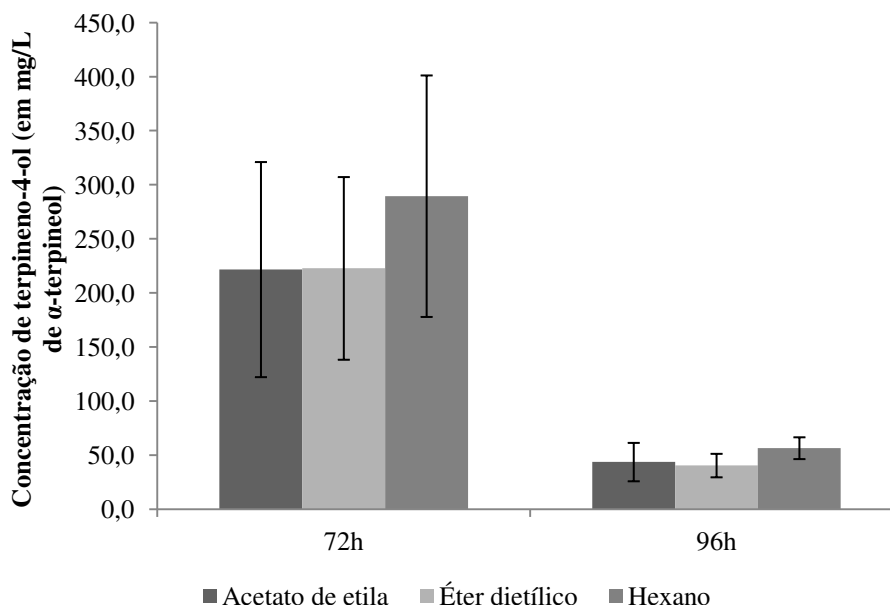
**Figura 20** – Micrografia eletrônica de varredura do micélio do fungo LBA1323 cultivado em YM sem indução enzimática (A e B) e com indução enzimática (C e D) (após 72 h); e micélio ao final do processo (após 96 h) de bioconversão com células sem indução enzimática (E e F) e com indução enzimática (G e H).



Em outro estudo, a influência dos solventes acetato de etila, clorofórmio e hexano foi avaliada na extração de verbenona produzida a partir da bioconversão de  $\alpha$ -pineno, onde verificou-se que o acetato de etila favorecia a formação de uma emulsão forte o suficiente para impedir o livre trânsito das moléculas de produto para a fase orgânica, descartando este solvente dos estudos posteriores. Entre clorofórmio e hexano, este último apresentou os melhores resultados na fase de extração, sendo o solvente escolhido pelos pesquisadores para o prosseguimento dos estudos em decorrência deste propiciar maior vida útil da coluna do cromatógrafo a gás (LIMBERGER; ALEIXO; FETT-NETO, 2007).

Neste estudo, contudo, não foi encontrada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na extração do terpineno-4-ol pelos três diferentes solventes testados, tanto nas amostras de 72 h quanto nas de 96 h (Figura 21, Tabela 6 do Material Suplementar), indicando que ambos os solventes podem ser utilizados para a extração de  $\alpha$ -pineno e seus produtos derivados a partir de processo fermentativo com a linhagem fúngica LBA1323.

**Figura 21** - Extração de terpineno-4-ol do caldo fermentado produzido pelo fungo LBA1323 com diferentes solventes.



Não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de médias ( $p < 0,05$ ) para extração de terpineno-4-ol.

O melhor solvente para a extração de produtos de bioconversão deve ser definido após a realização de testes que comprovem sua efetividade para a finalidade daquele estudo, visto que cada bioprocessos possui inúmeras especificidades. Portanto, diferentemente dos estudos discutidos anteriormente, para o caso aqui relatado não houve diferença estatística na quantidade de produtos extraídos com a utilização dos diferentes solventes.

Assim, os dados práticos foram desconsiderados como critérios de escolha. Logo, como uma série de estudos da literatura técnica da área apresenta em comum o uso do acetato de etila como solvente único, ou pelo menos um dos constituintes do sistema de extração, optou-se pela continuidade dos experimentos utilizando este composto como fase orgânica extratora, além do fato deste ser o solvente mais polar dentre os testados (BICAS *et al.*, 2008a; BIER *et al.*, 2017; MOLINA *et al.*, 2015).

### *3.3.6 Efeito da permeabilização celular na produção de terpineno-4-ol a partir de $\alpha$ -pineno pelo fungo LBA1323*

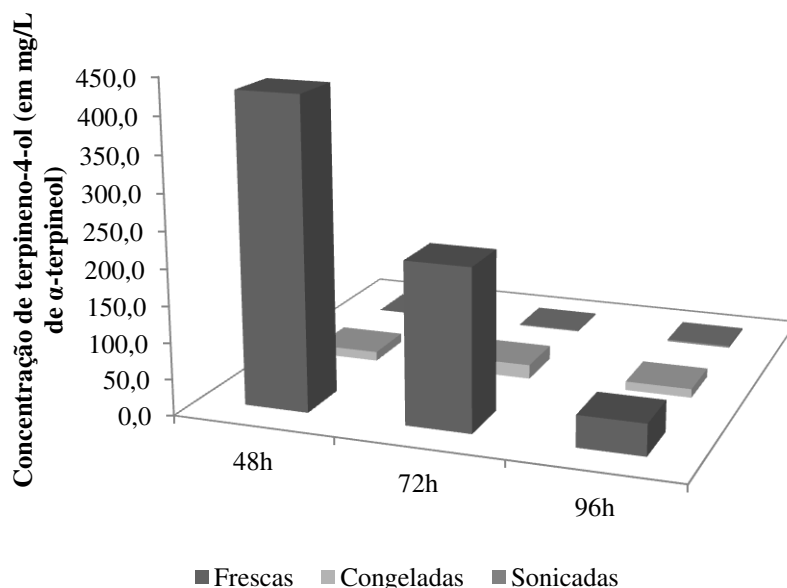
O uso de células inteiras em processo biotecnológicos apresenta algumas desvantagens que podem limitar sua utilização, tais como a limitação na transferência de massa e a dificuldade na reciclagem e imobilização de células (WACHTMEISTER; ROTHER, 2016). Dessa forma, técnicas de permeabilização celular por métodos químicos (solventes ou detergentes, por exemplo) e físicos (tratamentos térmicos) podem ser utilizadas a fim de propiciar uma melhoria na transferência de substrato e produtos formados através da parede e membrana celular (DE CARVALHO, 2017). Este tipo de tratamento também é útil para se verificar a dependência de cofatores enzimáticos, uma vez que o rompimento das células (uso de extratos enzimáticos) impede a regeneração de cofatores, somente possível com células inteiras (BICAS *et al.*, 2008a).

Além disso, sob um ponto de vista técnico, a possibilidade de liofilização de células favorece a padronização e simplifica os processos de inoculação, além de permitir o armazenamento da linhagem sem perda de atividade catalítica (MOLINA *et al.*, 2015). Entretanto, a linhagem LBA1323 foi injuriada após o processo de liofilização, não apresentando crescimento celular e tão pouco a produção de terpineno-4-ol, tal qual reportado por Molina e colaboradores (2015) para a produção  $\alpha$ -terpineol. Contudo, Krings *et al.* (2009) relataram que a produção de verbenol e verbenona foi elevada em 7 e 42 vezes, respectivamente, ao se utilizar células liofilizadas em comparação ao ensaio de fermentação submersa do fungo *Pleurotus sapidus*.

Enquanto isso, a permeabilização por sonicação não acarretou na inativação celular, no caso das células que passaram por sonicação houve uma redução no peso seco final,  $1,47 \pm 0,89$  g/L contra  $\sim 2$  g/L de inóculo inicial. Essa redução pode ser decorrente da redução de células viáveis ocasionada pelo rompimento celular, para mais a produção de terpineno-4-ol foi significativamente reduzida ( $2,57 \pm 1,53$  mg/L pA às 96 h) (Figura 22,

Tabela 7 do Material Suplementar), indicando a dependência de cofatores para a produção de terpineno-4-ol.

**Figura 22** - Efeito da permeabilização celular sobre a produção de terpineno-4-ol pelo fungo LBA1323.



Teste de médias ( $p < 0,05$ ) para produção de terpineno-4-ol: 48h e 72h – Células frescas (a) > Células congeladas (b) = Células sonicadas; 96h - Células frescas (a) > Células congeladas (a,b) > Células sonicadas (b).

Por outro lado, sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento favoreceram o crescimento celular do fungo LBA1323, com uma biomassa final de  $7,68 \pm 0,42$  g/L contra  $6,5 \pm 0,36$  g/L de células frescas. Apesar disso, a formação de terpineno-4-ol foi reduzida ( $12,18 \pm 0,85$  mg/L às 96 h), mas este valor ser estatisticamente ( $p < 0,05$ ) igual à produção em 96 h de processo com células frescas.

Contudo, foi verificado o incremento da produção de um composto minoritário não identificado (tempo de retenção 9,53 min -  $1,91E+06 \pm 1,35E+05$  pA às 72 h) ao se utilizar células congeladas, em comparação ao ensaio com células frescas ( $1,41E+06 \pm 6,26E+04$  pA), os quais foram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) distintos até o tempo de 72 h, indicando que essa técnica pode ter favorecido outra rota metabólica de bioconversão do  $\alpha$ -pineno.

Ao contrário do observado neste estudo, um incremento na seletividade da reação de formação de isonovalal foi reportado com *Pseudomonas rhodesiae* PF1 tratada com ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento (FONTANILLE; LE FLÈCHE; LARROCHE, 2002). Molina e colaboradores (2015) reportaram redução significativa da produção de limoneno-1,2-diol quando da utilização de ciclos sucessivos de congelamento e

descongelamento, contudo a aplicação de um único ciclo de congelamento não acarretou em perdas estatisticamente significativas de produção.

Muita embora estratégias de permeabilização celular sejam interessantes para se facilitar a padronização de inóculo e melhoria nas transferências de massa, o presente sistema não pode ser conduzido adotando tais métodos, uma vez que a aplicação destes não favorece a do produto alvo (terpineno-4-ol). Além disso, o uso de células inteiras também é requerido para a formação de terpineno-4-ol, dada a necessidade de regeneração de cofatores, indicada pelos resultados do teste com células rompidas por sonicação.

### *3.3.7 Efeito da adição de co-solvente no bioprocesso para a produção de terpineno-4-ol*

A baixa solubilidade de substratos monoterpênicos e sua alta toxicidade podem ser atenuadas pelo uso de sistemas bifásicos, adição de co-solventes ou sistemas de micelas reversas (surfactantes aniônicos), os quais contribuem também para uma melhoria na transferência de massa dos sistemas de bioconversão (TAN; DAY, 1998).

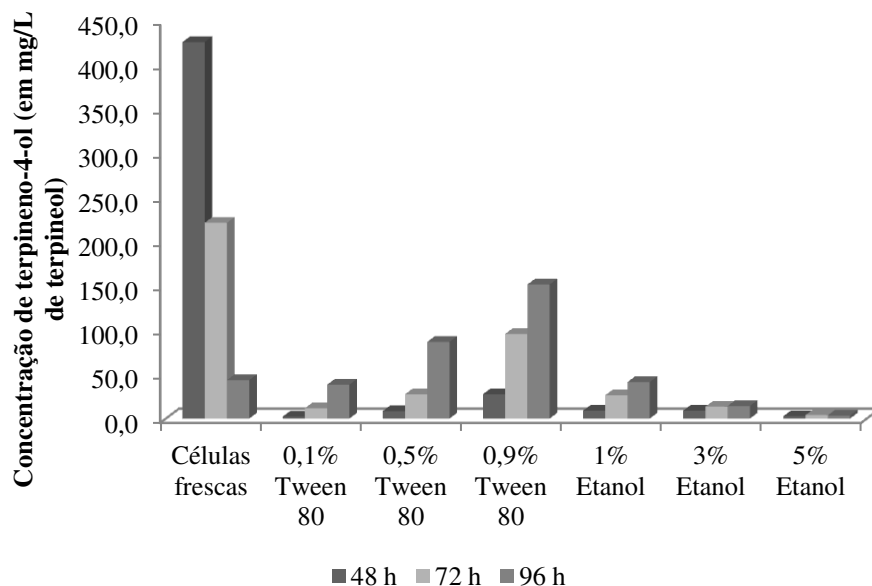
Apesar disso, a escolha do co-solvente deve ser feita de forma criteriosa, pois muitos solventes orgânicos são altamente tóxicos ou inibitórios (ADAMS; DEMYTTENAERE; DE KIMPE, 2003). Por outro lado, o uso de sistemas de micelas reversas não afeta a estabilidade dos biocatalisadores, mas devem igualmente ser bem dosados em função da dificuldade de recuperação dos produtos ao final do processo (SALTER; KELT, 1995). Neste âmbito, foram avaliados o efeito da adição de etanol (variando de 1, 3 e 5%, v/v) e do surfactante aniônico Tween 80 (de 0,1; 0,5 e 0,9%, v/v), bem como da relação dose resposta, sobre a formação de terpineno-4-ol.

O sistema de bioconversão padrão, utilizando neste estudo, foi afetado pelo uso de etanol como co-solvente nos tempos de 48 e 72 h em todas as concentrações testadas, em comparação ao ensaio padrão ( $p < 0,05$ ). A relação dose-resposta sobre a produção de terpineno-4-ol foi verificada através decréscimo da produção face ao aumento da concentração do co-solvente, indicando um prejuízo ao crescimento celular que está atrelado à produção de terpineno-4-ol (Figura 23, Tabela 8 e Tabela 9 do Material Suplementar).

Contrariamente ao resultado obtido com o uso de etanol, o aumento da produção de terpineno-4-ol foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de Tween 80. Enquanto isso, a adição de Tween 80 (0,9%, v/v) representou um ganho de produção do terpineno-4-ol ( $151 \pm 114$  mg/L) em comparação ao ensaio padrão ( $43 \pm 17$  mg/L), após 96 h de processo. Ao passo que, nos demais tempos e concentrações testadas houve redução na

produção de terpineno-4-ol (Figura 23). Nielsen e colaboradores (2016) relatam que a adição de concentrações crescentes de Tween 80 pode reduzir a eficácia antibacteriana de óleo essencial de tomilho.

**Figura 23** - Efeito da adição de co-solventes na produção de terpineno-4-ol pela linhagem fúngica LBA1323.



Tal qual observado no presente trabalho, a adição de etanol (1%) combinado com a estratégia de adição seriada de  $\beta$ -pineno (1%, v/v) teve efeito positivo na conversão de  $\alpha$ -terpineol (3,68% de conversão) por *Aspergillus niger*, apesar disso, uma única adição de etanol acarretou em redução da conversão (0,27%) em comparação ao ensaio padrão (1,8% de conversão) (TONIAZZO *et al.*, 2005).

De forma análoga, o uso de etanol de 2% (v/v) e Tween 80 (0,1%, v/v) acarretaram na redução da conversão de (*R*)-(+)-limoneno a  $\alpha$ -terpineol por *Penicillium digitatum* em 117% e 6,4%, respectivamente (TAN; DAY, 1998). Por outro lado, o uso de etanol como co-solvente propiciou aumento na produção de  $\alpha$ -terpineol por *Penicillium digitatum*, contudo não foi possível obter uma correlação entre a concentração e resposta (ADAMS; DEMYTTENAERE; DE KIMPE, 2003).

O uso de etanol como co-solvente no bioprocessamento para a produção de terpineno-4-ol não teve impacto positivo em nenhuma das concentrações e tempos avaliados, tal fato pode estar correlacionado a um efeito tóxico sobre as células do fungo LBA1323. Por outro lado, a aplicação de sistema de micelas reversas com Tween 80 (0,9%, v/v) representou um ganho na produção de terpineno-4-ol após 96 h de processo. Teoricamente, poderia se inferir que aumentar a concentração de Tween 80 aplicada acarretaria em maior produção, uma vez

que a dose-resposta do surfactante aplicado e produto formado é diretamente proporcionais. Contudo Tan e Day (1998) não indicam a utilização de concentrações superiores a 1% (v/v), pois acima desse valor podem ocorrer dificuldades na recuperação do produto.

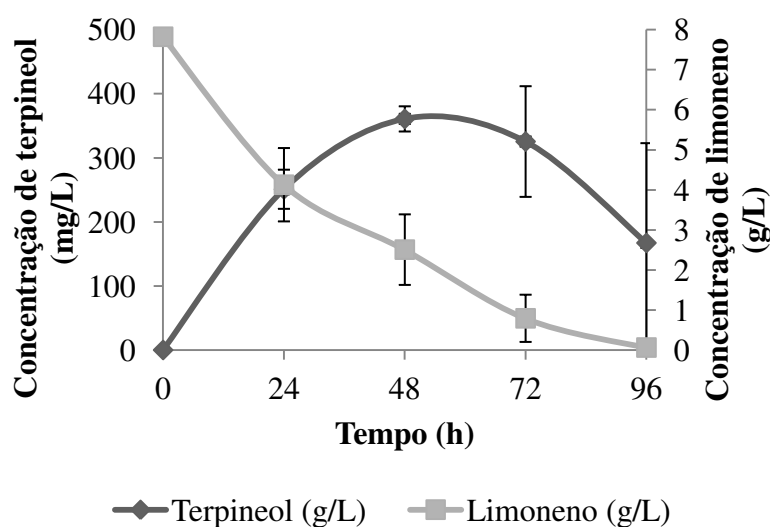
### 3.3.8 Bioconversão de limoneno a $\alpha$ -terpineol pelo fungo LBA1323

A formação de limoneno e  $\alpha$ -terpineol foi constatada como uma rota secundária na bioconversão de  $\alpha$ -pineno pela linhagem fúngica LBA1323 (Figura 16), inferindo que as enzimas envolvidas na bioconversão de limoneno a  $\alpha$ -terpineol estão presentes no metabolismo desse fungo. Neste sentido, foram conduzidos ensaios de bioconversão de limoneno (1%, v/v) com o fungo LBA1323, de modo a se verificar se essa rota de degradação é favorecida quando o meio está suplementado exclusivamente com limoneno.

Neste estudo, a linhagem fúngica LBA1323 acumulou aproximadamente  $360 \pm 56$  mg/L de  $\alpha$ -terpineol após 48 h de processo (Figura 24), atingindo produtividade volumétrica de  $7,52 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e rendimento de 0,068 g/g ( $\alpha$ -terpineol/limoneno), ou 6,78 % de bioconversão. Além da formação do  $\alpha$ -terpineol também foi verificada a formação de 2 compostos não identificados.

Tal qual esperado, a formação de  $\alpha$ -terpineol foi favorecida ao se utilizar limoneno como substrato ( $360 \pm 56$  mg/L), em razão da produção máxima no ensaio utilizando  $\alpha$ -pineno ter sido de  $102 \pm 19$  mg/L após 72 h de processo.

**Figura 24** - Bioprodução de  $\alpha$ -terpineol (losangos) a partir de limoneno (quadrados) pela a linhagem fúngica LBA1323 a 30°C, 150 rpm por 96 h.



A bioconversão de (*R*)-(+)-limoneno a  $\alpha$ -terpineol já foi relatada na literatura para diversas espécies fúngicas, *Penicillium digitatum* (93% de conversão) (ADAMS; DEMYTTENAERE; DE KIMPE, 2003), *Fusarium oxysporum* 152B (~ 2,4 g/L sob condições otimizadas) (BICAS *et al.*, 2008b), *Penicillium digitatum* (TAN; DAY, 1998), *Phomopsis* sp (34,22 mg/L) (BIER *et al.*, 2017), entre outros.

O  $\alpha$ -terpineol, obtido a partir de limoneno, é caracterizado por um aroma de pinho, amadeirado e resinoso, com nuances cítricas de limão e lima, e um floral seco (BURDOCK, 2010). É o composto majoritário de óleos de *Origanum vulgare* L. and *Ocimum canum*, mas também pode ser encontrado em óleos cítricos, de pinho, de extraídos de plantas da família *Myrtaceae*, de cajeput e petitgrain. Tal qual o terpineno-4-ol, também há relatos na literatura sobre as atividades bioativas do  $\alpha$ -terpineol, tais como: atividade antioxidante, anticancerígena, antinociceptiva, antiulcerativa, anticonvulsivante, inseticida, antibronquite e anti-hipertensivo, além de efeitos benéficos para o sistema cardiovascular (KHALEEL; TABANCA; BUCHBAUER, 2018).

Deste modo, além da produção de terpineno-4-ol a partir de  $\alpha$ -pineno, o fungo LBA1323 também é capaz de produzir outro terpineol de interesse a partir do limoneno, mostrando sua versatilidade. Cabendo ainda, tal qual realizado para a formação de terpineno-4-ol, estudos para tentar otimizar a produção de  $\alpha$ -terpineol a partir do limoneno.

### 3.4 Conclusão

Um método de seleção conduzido exclusivamente em estado sólido de linhagens resistentes a monoterpenos e capazes de utilizá-los como fonte de carbono foi proposto e testado, resultando na seleção da linhagem fúngica LBA1323 isolada de frutos de *Eucalyptus* spp. O método proposto consiste de apenas 3 plaqueamentos sucessivos com duração de 9 dias, sendo, portanto mais rápido e barato que o método convencional, que envolve ao menos 3 plaqueamentos e 2 fermentações submersas com duração de 15 a 28 dias.

A linhagem fúngica LBA1323 demonstrou-se potencial para a bioconversão de  $\alpha$ -pineno a terpineno-4-ol (426,14 $\pm$ 140,92 mg/L), tratando-se de processos não indutíveis ao substrato. Também foi demonstrando que o  $\alpha$ -pineno, e possivelmente o terpineno-4-ol, induzem alterações na morfologia das hifas do fungo LBA1323, sendo um importante atributo para a configuração do bioprocesso conduzido.

Além disso, a utilização de estratégias como a permeabilização celular, indução enzimática e utilização de co-solventes, foram avaliadas com o intuito de aumentar a



produção de terpineno-4-ol. Entretanto, nenhuma delas mostrou-se efetiva para propiciar um ganho na produção de terpineno-4-ol a partir de  $\alpha$ -pineno. A liofilização e a utilização de etanol (> 3%,v/v) foram letais para o fungo LBA1323, e os ciclos de congelamento e descongelamento favoreceram a produção de um produto minoritário em detrimento ao terpineno-4-ol. Estudos futuros da otimização das condições de processo e de meio de cultivo poderão ser conduzidos para aumentar a produção de ambos os produtos.

A via de degradação de limoneno a  $\alpha$ -terpineol estava presente na bioconversão de  $\alpha$ -pineno pelo fungo LBA1323 como rota secundária, neste sentido a condução da bioconversão de limoneno (1%, v/v) pela mesma cepa foi realizada, mostrando um favorecimento da formação de  $\alpha$ -terpineol ( $360 \pm 56$  mg/L). Isso demonstra a versatilidade dessa linhagem e abre possibilidade para estudos de otimização da produção de  $\alpha$ -terpineol a partir de limoneno.

Em suma, a seleção de linhagens por um método conduzido exclusivamente em estado sólido gera ganhos pela redução do tempo total do experimento, volume de material, facilidade de execução e condução com número elevado de linhagens a serem testadas. O bioprocesso proposto com a linhagem LBA1323 para a produção de terpineno-4-ol é substancialmente interessante, dada a escassez de relatos da produção desse composto por processos fermentativos e do potencial bioativo associado a esta molécula. Além disso, a linhagem LBA1323 é capaz de se utilizar dois monoterpenos, limoneno e  $\alpha$ -pineno, para a síntese de compostos valorizados por indústrias do ramo farmacêutico, alimentício, cosméticos e materiais de limpeza, o terpineno-4-ol e o  $\alpha$ -terpineol.

Para mais, estudos futuros de otimização de processos, recuperação *in situ* e operação em sistemas bifásicos podem tornar ambos os bioprocessos propostos ainda mais interessantes face a um aumento da produção de terpineno-4-ol e  $\alpha$ -terpineol.

## REFERÊNCIAS

- ABOLGHASEMI, Z.; HESHMATIPOUR, Z.; MEYBODI, M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms from citrus waste water of citrus processing plant of Kosarin Ramsar-Iran. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 11, p. 134–141, 2013.
- ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J. C. R.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* - Investigation of the culture conditions. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 525–534, 2003.
- BICAS, J. L. et al. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1991–2001, 2008a.
- BICAS, J. L. et al. Optimization of R-(+)- $\alpha$ -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1061–1070, 17 set. 2008b.
- BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 563–567, 2007.
- BIER, M. C. J. et al. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. **Fungal Biology**, v. 2, n. 2, p. 137–144, 2017.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Terpinen-4-ol, tyrosol, and  $\beta$ -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 917–924, out. 2016.
- BURDOCK, G. A. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 6nd. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2010.
- CECATI, F. M. et al. Ecofriendly chemical diversification of *Eupatorium buniifolium* essential oil by endophytic fungi. **Process Biochemistry**, v. 64, n. June 2017, p. 93–102, 2018.
- DE CARVALHO, C. C. C. R. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 250–263, 2017.
- DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Towards the bio-production of *trans*-carveol and carvone from limonene: Induction after cell growth on limonene and toluene. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 14, n. 24, p. 3925–3931, 2003.
- DEEPTHI PRIYA, K.; PETKAR, M.; CHOWDARY, G. V. Isolation , screening and identification of terpene resistant microorganisms from decayed yellow orange citrus fruits. **Research and Reviews : Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 12–21, 2014.
- FAROOQ, A. et al. The microbial oxidation of (-)-beta-pinene by *Botrytis cinerea*. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 57, n. 7–8, p. 686–90, 2002.
- FONTANILLE, P.; LE FLÈCHE, A.; LARROCHE, C. *Pseudomonas rhodesiae* PF1: A New

and Efficient Biocatalyst for Production of Isonovalal from  $\alpha$ -pinene Oxide. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 20, n. 6, p. 413–421, 11 jan. 2002.

GARCÍA-CARNELLI, C. et al. Influence of culture conditions on the biotransformation of (+)-limonene by *Aspergillus niger*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 69 C, n. 1–2, p. 61–67, 2014.

KHALEEL, C.; TABANCA, N.; BUCHBAUER, G.  $\alpha$ -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. **Open Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 349–361, 25 abr. 2018.

KRINGS, U. et al. Autoxidation versus Biotransformation of  $\alpha$ -Pinene to Flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective Hydroperoxidation of  $\alpha$ -Pinene and Stereoselective Dehydrogenation of Verbenol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 9944–9950, 11 nov. 2009.

LIMBERGER, R. P.; ALEIXO, A. M.; FETT-NETO, A. G. Bioconversion of (+)- and (-)- $\alpha$ -pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 6–13, 2007.

MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Production of R-(+)- $\alpha$ -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 345–350, 2006.

MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Production of R-(+)- $\alpha$ -terpineol by the biotransformation of limonene from Orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Science**, v. 101, p. 345–350, 2007.

MERCIER, B.; PROST, J.; PROST, M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction ( $\alpha$ - and  $\beta$ -pinenes): A review. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 22, n. 4, p. 331–342, 2009.

MOLINA, G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Food Chemistry**, v. 174, p. 606–613, 2015.

MORCIA, C.; MALNATI, M.; TERZI, V. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. **Food Additives & Contaminants: Part A**, n. September 2013, p. 1–8, 24 nov. 2011.

NIELSEN, C. K. et al. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–10, 22 nov. 2016.

NIST. **Standard Reference Database 69: NIST Chemistry WebBook. 2018**. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/>>. Acesso em: 9 abr. 2018.

ORIEL, P. J.; SAVITHIRY, S.; CHANG, H. C. **Process for the preparation of monoterpenes using bacterium containing recombinant DNA**, 1997.

ROTTAVA, I. et al. Microbial oxidation of (-)- $\alpha$ -pinene to verbenol production by newly isolated strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2221–2231, 6

dez. 2010.

SALTER, G. J.; KELT, D. B. Solvent selection for whole cell biotransformations in organic media. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 139–177, 1995.

SAVITHIRY, N. et al. Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. **Biodegradation**, v. 9, n. 5, p. 337–341, 1998.

SCHRADER, J. Microbial flavor production. In: BERGER, R. G. (Ed.). . **Flavours and Fragrances- Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.

SHAO, X. et al. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 6, p. 1642–1649, jun. 2013.

TAN, Q.; DAY, D. F. Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)- $\alpha$ -terpineol. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 755–761, 1998.

TONIAZZO, G. et al. Biotransformation of (-) $\beta$ -Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 123, n. 1–3, p. 0837–0844, 2005.

VAN DER WERF, M.; DE BONT, J.; LEAK, D. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 55, p. 147–177, 1997.

VESPERMANN, K. A. C. et al. Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, 2017.

WACHTMEISTER, J.; ROTHER, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 169–177, dez. 2016.

YADAV, E.; RAO, R. A promising bioactive component terpinen-4-ol: a review. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 3, n. 8, p. 336–345, 2016.

YOO, S. K.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene by *Pseudomonas* sp. strain PIN. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 925–932, 2001.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na atual conjuntura, a exploração da diversidade microbiana de ambientes naturais para obtenção de biocatalisadores robustos para aplicação em processos biotecnológicos de produção de aromas é uma alternativa barata e passível de descobertas promissoras.

De forma inédita foram isolados 15 microrganismos do subarbusto *Polygala fimbriata*, dos quais 10 bactérias mostraram-se resistentes ao limoneno e 9 bactérias resistentes ao  $\alpha$ -pineno. Dentre as quais, as linhagens LBA1213 (identificada como *Bacillus mycoides*) e LBA12111 (identificada como *Bacillus* spp.) mostraram-se excelentes catalisadores para utilização na bioconversão de  $\alpha$ -pineno, contudo sem êxito para a bioconversão de limoneno. Além disso, o *Bacillus* spp. se mostrou resistente elevadas concentrações de  $\alpha$ -pineno e limoneno (até 10% v/v), e o *Bacillus mycoides* apenas ao  $\alpha$ -pineno, denotando seu potencial de metabolização desses substratos.

*Bacillus mycoides* e *Bacillus* spp. foram utilizadas em processos de bioconversão de  $\alpha$ -pineno, observando-se a formação majoritária de verbenol (399, 16 mg/L e 261,31 mg/L, respectivamente) e de 2 produtos não identificados para ambas as linhagens. Tratando-se da síntese de verbenol nas maiores concentrações já relatadas por linhagens de *Bacillus*. Além disso, este é primeiro relato da literatura para estudos da resistência e bioconversão de monoterpenos por *Bacillus mycoides*, e do isolamento de microrganismos de *Polygala fimbriata*.

A utilização de um método em estado sólido com duração de 9 dias foi proposta em detrimento da utilização dos métodos convencionais, que utilizam cultivo em fermentação submersa em combinação com estado sólido (15 a 28 dias), para a seleção de linhagens para bioconversão de monoterpenos. Mostrando uma alternativa eficaz e mais rápida para a obtenção de linhagens robustas aplicáveis para a condução de bioprocessos visando a obtenção de derivados terpênicos.

Diante da utilização do método de seleção em estado sólido, selecionou-se uma linhagem fúngica isolada de *Eucalyptus* spp. capaz de bioconverter limoneno e  $\alpha$ -pineno em terpeneois, moléculas de alto interesse da indústria e com enorme potencial bioativo associado. O bioprocessos proposto com a linhagem LBA1323 para a produção de terpineno-4-ol é substancialmente interessante, dada a escassez de relatos da produção desse composto por processos fermentativos. Além disso, a linhagem LBA1323 é consideravelmente robusta, capaz de se utilizar dois monoterpenos, limoneno e  $\alpha$ -pineno, para a síntese de compostos

valorizados por indústrias do ramo farmacêutico, alimentício, cosméticos e materiais de limpeza, o terpineno-4-ol ( $426,14 \pm 140,92$  mg/L) e o  $\alpha$ -terpineol ( $360 \pm 56$  mg/L).

O estudo do bioprocesso para a produção de terpineno-4-ol pela linhagem LBA1323 é não indutível e dependente de cofatores. Melhorias na produtividade não puderam ser alcançadas utilizando-se etanol como co-solvente ou sistemas de micelas reversas.

Para mais, estudos futuros de otimização de processos, recuperação *in situ* e operação em sistemas bifásicos e utilização de células em crescimento podem tornar ambos os bioprocessos propostos ainda mais interessantes face a um aumento da produção de verbenol, terpineno-4-ol e  $\alpha$ -terpineol. Outrossim, a linhagem *Bacillus* spp. pode também ser avaliada quanto a um melhoramento genético por técnicas de engenharia genética, em função da sua resistência a 10% (v/v) de limoneno e  $\alpha$ -pineno e do potencial intrínseco das linhagens de *Bacillus* em expressar proteínas relacionadas às rotas de formação de terpenóides.

## APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 4** – Caracterização morfológica e composição de parede celular dos isolados da *Polygala fimbriata*.

Microrganismo	Coloração de Gram	Formato	Tamanho (mm)	Forma	Cor	Elevação	Borda	Superfície	Detalhe ótico	Consistência
LBA1211	Gram-Positiva	Bastonete	< 1	Irregular	Branco	Lente	Ondulada	Rugosa	Opaca e translúcida	Seca
LBA1212	Gram-Negativa	Bastonete	< 1	Circular	Creme	Plana	Inteira	Lisa	Brilhante e transparente	Pouco mucosa
LBA1213	Gram-Positiva	Bastonete	>2	Irregular	Creme	Plana	Filamentosa	Enrugada	Opaca e translúcida	Pouco mucosa
LBA1214	Gram-Positiva	Bastonete	< 1	Circular	Creme	Plana	Lobada	Enrugada	Brilhante e translúcida	Pouco mucosa
LBA1215	Gram-Positiva	Bastonete	< 1	Circular	Creme	Lente	Inteira	Lisa	Brilhante e translúcida	Pouco mucosa
LBA1216	Gram-Negativa	Bastonete	< 1	Irregular	Creme	Convexa	Ondulada	Lisa	Brilhante e translúcida	Mucosa
LBA1217	Gram-Positiva	Bastonete	< 1	Irregular	Amarela	Plana	Filamentosa	Rugosa	Opaca e translúcida	Seca
LBA1218	Gram-Positiva	Bastonete	< 1	Irregular	Creme	Plana	Ondulada	Lisa	Brilhante e translúcida	Pouco mucosa
LBA1219	Gram-Negativa	Cocos	<1	Irregular	Creme	Lente	Ondulada	Rugosa	Brilhante e translúcida	Pouco mucosa
LBA12110	Gram-Negativa	Bastonete	< 1	Irregular	Branco	Plana	Ondulada	Enrugada	Opaca e translúcida	Seca
LBA12111	Gram-Positiva	Bastonete	< 1	Irregular	Branco gelo	Lente	Ondulada	Enrugada	Brilhante e translúcida	Pouco mucosa
LBA12112	Gram-Negativa	Bastonete	< 1	Irregular	Creme claro	Plana	Lobada	Enrugada	Transparente	Pouco mucosa
LBA12113	Não se aplica								Fungo filamentoso	
LBA12114	Não se aplica								Fungo filamentoso	
LBA12115	Gram-Negativa	Bastonete	< 1	Circular	Amarela	Convexa	Inteira	Lisa	Brilhante e translúcida	Pouco mucosa

**Legenda:** LBA – Laboratório de Biotecnologia de Alimentos.

**Tabela 5** - Produção de terpineno-4-ol e crescimento microbiano para a linhagem fúngica LBA1323 com e sem indução enzimática.

Tempo (h)	Terpineno-4-ol (mg/L de $\alpha$ -terpineol)		Biomassa (g/L)	
	Sem indução	Com indução	Sem indução	Com indução
0	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c,A</sup>	0,91 $\pm$ 0,03 <sup>a,B</sup>	1,98 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>
24	259,42 $\pm$ 22,55 <sup>a,b,A</sup>	4,48 $\pm$ 1,46 <sup>a,B</sup>	2,39 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,77 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>
48	426,14 $\pm$ 140,92 <sup>a,A</sup>	14,26 $\pm$ 0,13 <sup>a,B</sup>	5,79 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	2,21 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
72	221,58 $\pm$ 99,46 <sup>a,b,c,A</sup>	125,68 $\pm$ 28,28 <sup>b,A</sup>	6,47 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	3,89 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>
96	43,56 $\pm$ 17,75 <sup>b,c,A</sup>	165,33 $\pm$ 33,60 <sup>b,A</sup>	6,5 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	4,31 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>

Letras minúsculas (a, b, c) diferentes nas colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de Tukey. Letras maiúsculas (A e B) diferentes nas linhas do terpineno-4-ol indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) pelo Teste T de Student.

**Tabela 6** - Extração de terpineno-4-ol do caldo fermentado produzido pelo fungo LBA1323 com diferentes solventes.

Tempo (h)	Concentração de terpineno-4-ol (mg/L de $\alpha$ -terpineol)		
	Acetato de etila	Éter dietílico	Hexano
72	221,58 $\pm$ 99,46 <sup>a</sup>	222,68 $\pm$ 84,47 <sup>a</sup>	289,46 $\pm$ 111,68 <sup>a</sup>
96	43,56 $\pm$ 17,75 <sup>a</sup>	40,34 $\pm$ 10,86 <sup>a</sup>	56,40 $\pm$ 10,08 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7** - Efeito da permeabilização celular sobre a produção de terpineno-4-ol pelo fungo LBA1323.

Tempo (h)	Concentração de terpineno-4-ol (mg/L de $\alpha$ -terpineol)		
	Células frescas	Células congeladas	Células sonificadas
48	426,14 $\pm$ 140,92 <sup>a</sup>	12,75 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>	0,14 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>
72	221,58 $\pm$ 99,46 <sup>a</sup>	19,54 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	1,52 $\pm$ 0,98 <sup>b</sup>
96	43,56 $\pm$ 17,75 <sup>a</sup>	12,18 $\pm$ 0,85 <sup>a,b</sup>	2,57 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup>

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8** - Efeito da adição de Tween 80 sobre a produção de terpineno-4-ol pelo fungo LBA1323.

Tratamento	Concentração de terpineno-4-ol (mg/L de $\alpha$ -terpineol)		
	48 h	72 h	96 h
Células frescas	426,14 $\pm$ 140,92 <sup>a</sup>	221,58 $\pm$ 99,46 <sup>a</sup>	43,56 $\pm$ 17,75 <sup>a</sup>
Tween 80 (0,1%)	2,15 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	11,72 $\pm$ 2,70 <sup>b</sup>	38,34 $\pm$ 16,71 <sup>a</sup>
Tween 80 (0,5%)	8,51 $\pm$ 3,83 <sup>b</sup>	27,46 $\pm$ 14,58 <sup>b</sup>	86,81 $\pm$ 55,48 <sup>a</sup>
Tween 80 (0,9%)	27,52 $\pm$ 5,68 <sup>b</sup>	95,83 $\pm$ 55,29 <sup>a,b</sup>	151,71 $\pm$ 114,33 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9** - Efeito da adição etanol sobre a produção de terpineno-4-ol pelo fungo LBA1323.

Tratamento	Concentração de terpineno-4-ol (mg/L de $\alpha$ -terpineol)		
	48 h	72 h	96 h
Células frescas	426,14 $\pm$ 140,92 <sup>a</sup>	221,58 $\pm$ 99,46 <sup>a</sup>	43,56 $\pm$ 17,75 <sup>a</sup>
Etanol (1%)	8,87 $\pm$ 1,66 <sup>b</sup>	26,42 $\pm$ 5,05 <sup>b</sup>	41,33 $\pm$ 20,08 <sup>a</sup>
Etanol (3%)	8,92 $\pm$ 1,46 <sup>b</sup>	13,44 $\pm$ 1,04 <sup>b</sup>	14,23 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup>
Etanol (5%)	2,58 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	3,92 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	3,35 $\pm$ 1,83 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).